

JANAÍNA KOHL BARBIERO

ADMINISTRAÇÃO AGUDA MAS NÃO CRÔNICA DE PIOGLITAZONA
PROMOVEU EFEITOS PROTETORES COMPORTAMENTAIS E
NEUROQUÍMICOS NO MODELO DE MPTP DA DOENÇA DE PARKINSON

Orientadora: Dra. Maria Aparecida B. F. Vital

Co-orientador: Dr. Marcelo M. S. Lima

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

2010

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”

Charles Chaplin

***Aos meus pais, Elio Barbiero e Valéria D. K. Barbiero e ao meu irmão Jeferson
M. Barbiero.***

Pelo amor incondicional, pelo sacrifício, apoio e incentivo constantes!

Por tudo o que representam em minha vida!!

Esta vitória é nossa!

Ao meu namorado Vinícius do Vale Assis

“...é preciso amar direito, ser amor de qualquer jeito, ter amor a qualquer hora, ter amor de corpo inteiro, amor de dentro pra fora, amor que eu desconheço..”(Jota Quest – Amor Maior).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e capacidade para realizar e concluir este trabalho;

À minha orientadora e amiga Profa Dra. Maria A. B. F. Vital, pela amizade e compreensão em todos os momentos, pelos conselhos sensatos, pela sabedoria, ensinamentos e amor à pesquisa!

Ao meu co-orientador Marcelo M. S. Lima, pelas importantes sugestões que proporcionaram um trabalho mais completo;

Aos membros da banca pelo aceite e disponibilidade;

Ao departamento de Farmacologia da UFPR pela oportunidade, aos professores em especial ao professor Dr. Roberto Andreatini pelo auxílio no término de meus experimentos, ao professor Dr. Herbert Trebien pelas conversas animadoras;

À minha mãe, Valéria D. K. Barbiero, pelo exemplo de dedicação e perseverança; pelo entusiasmo e coragem que sempre me foram dedicados, por me ajudar a superar a distância, pela presença em todos os momentos! Ao meu pai Elio Barbiero e ao meu irmão, Jeferson Márcio Barbiero, pelo apoio e incentivo, pelo amor e carinho constantes em minha vida.

Ao meu namorado Vinícius V. Assis, pela paciência, companheirismo, apoio, compreensão, carinho e, sobretudo, amor! Você foi fundamental nesta etapa! Te amo!

Ao meu padrinho Pe. José Viani pelo ânimo, coragem e apoio para que eu fosse em busca de crescimento profissional e pessoal, que fortaleceu a minha fé possibilitando assim o desempenho deste trabalho!

À amiga Irinéia Baretta, por ter sido inspiração para a concretização do sonho de fazer mestrado e por ter contribuído de forma tão importante na realização desta conquista, meu especial agradecimento!

À amiga Ronise Santiago, pelos muitos momentos que compartilhamos, por enfrentar as dificuldades comigo, pela companhia e auxílio constantes! Obrigada amiga!

À Camila G. Moreira, que foi meu alicerce desde o início! Que me ajudou a reencontrar minha autoconfiança! Pela amizade e carinho! Obrigada Cã!

Aos amigos: Deborah Ariza, Edmar Miyoshi, Daniel Mendes, Livia M. Reck, , Francine Potrich, Stéfani Rossi, Patrícia Dombrowski e a todos os colegas e amigos do departamento de farmacologia da UFPR que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

As grandes amigas: Litiara Dors, Tamiane Dors, Anita Tomazini, Joseli David, Sandiele da Silva, Deborah Biandaro (*in memoriam*), que também estiveram ao meu lado nesta etapa e torceram por meu mérito. Amo vocês!

Aos meus tios Martinho W. Kohl, Maria Dilma Kohl e primos César A. Kohl e Adriane C. Kohl, pelos momentos de distração, pelo acolhimento nos primeiros dias e por muitos finais de semana em sua casa, pela companhia, carinho, apoio, muito obrigada!!

À farmacêutica e amiga Sílvia Nardi Cordazzo pela assistência, pelas conversas e momentos de descontração!

A todos os funcionários do departamento de farmacologia da UFPR, em especial à Linda e Nair.

Aos animais utilizados nos experimentos.

Ao REUNI e CNPq pelo apoio financeiro

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. HISTÓRICO.....	1
1.2. SINAIS E SINTOMAS DA DOENÇA DE PARKINSON.....	2
1.3. FISIOPATOLOGIA DA DP.....	3
1.4. ETIOLOGIA DA DP.....	5
1.4.1. Alterações genéticas.....	6
1.4.2. Fatores ambientais.....	7
1.4.3. Disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e excitotoxicidade	8
1.4.4. Neuroinflamação e DP.....	10
1.5. MODELOS ANIMAIS NA DP.....	12
1.5.1. 6-OHDA.....	13
1.5.2. Paraquat	14
1.5.3. Rotenona.....	16

1.5.4. MPTP.....	17
1.6. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DP.....	19
1.7. NOVAS ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS PARA A DP: POSSÍVEL PAPEL DAS GLITAZONAS NA NEUROPROTEÇÃO DOPAMINÉRGICA.....	20
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. OBJETIVO GERAL.....	26
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
ARTIGO CIENTÍFICO.....	27
4. CONCLUSÕES.....	59
4.1. CONCLUSÃO GERAL.....	59
4.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA - 6-hidroxidopamina

BHE – barreira hematoencefálica

COMT – catecol-o-metiltransferase

COX-1 – ciclooxigenase-1

COX-2 – ciclooxigenase -2

DA - dopamina

DAT – transportador da dopamina

DOPAC – ácido 3,4-diidroxifenilacético

DP – doença de Parkinson

GFAP – proteína ácida fibrilar glial

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

MAO-A – monoamina oxidase-A

MAO-B – monoamina oxidase-B

MPP⁺ - 1-metil-4-fenilpiridinium

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

NFkB – fator nuclear kappa B

NMDA – N-metil-D-aspartato

NO – óxido nítrico

PPAR- γ - receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

PPRE – elementos responsivos a proliferadores de peroxissoma

ROS – espécies reativas de oxigênio

RXR – receptor do ácido retinóico

SNC – sistema nervoso central

SNpc – substância negra pars compacta

TZD - Tiazolidinediona

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta (SNpc). A DP é a segunda doença neurodegenerativa depois da doença de Alzheimer, afetando aproximadamente 1% da população em torno dos 65 anos. A doença é caracterizada clinicamente por tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural. A pioglitazona, um agonista dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR- γ) tem sido mostrado por atenuar a perda celular dopaminérgica no modelo animal 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) da DP, um efeito atribuído às suas propriedades anti-inflamatórias.

O presente estudo investigou os efeitos motores e cognitivos obtidos pela pioglitazona, um agonista dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), em um modelo de doença de Parkinson induzido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) intranigral. No primeiro experimento nós realizamos uma curva dose-resposta comportamental e neuroquímica após uma única administração de pioglitazona oral (5, 15 e 30mg/kg) 1 hora após MPTP. Um dia após a exposição à neurotoxina nós demonstramos que somente a pioglitazona de 30mg/kg foi capaz de restaurar as concentrações estriatais de dopamina e o comportamento motor. Um segundo experimento foi conduzido para testar os efeitos de dois protocolos (agudo e crônico) da administração de pioglitazona de 30mg/kg no teste do campo-aberto, esquiva ativa de duas vias e nos níveis da DA e seus metabólitos. O protocolo agudo consistiu em uma única administração 1 hora

após MPTP. Já o protocolo crônico foi realizado com administrações diárias de pioglitazona de 30mg/kg durante 22 dias, iniciando uma hora após MPTP. Resultados mostraram que ambos os protocolos não foram suficientes para reverter o prejuízo cognitivo promovido por MPTP. Nós também demonstramos que o tratamento agudo gerou alguns níveis de neuroproteção, como confirmado pela ausência da redução de DA no grupo tratado com pioglitazona em comparação com o grupo sham. Em contrapartida, o tratamento crônico levou a uma redução da DA estriatal, causada pelo MPTP. Estes achados sugerem que a administração aguda de pioglitazona 30mg/kg foi mais eficiente para gerar efeitos benéficos no comportamento motor e nos níveis de DA estriatais. No entanto, nós não conseguimos demonstrar melhora na cognição relatada pela DA após MPTP.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterised by degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). PD is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease, affecting approximately 1% of the population over the age 65. The disease is characterized clinically by resting tremor, rigidity, bradykinesia, and postural instability. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) agonist pioglitazone has previously been shown to attenuate dopaminergic cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of PD, an effect attributed to its anti-inflammatory properties. The present study investigated the neurochemical, motor and cognitive effects elicited by pioglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, in a rat model of Parkinson's disease induced by intranigral 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). In the first experiment we performed a behavioral (open-field test) and neurochemical dose response curve after a single administration of oral pioglitazone (5, 15 and 30mg/kg) 1 h after MPTP. One day after the neurotoxin exposure we demonstrated that only at 30mg/kg pioglitazone was capable to restore striatal DA concentrations and the motor behaviors. A second experiment was conducted to test the effects of two protocols (acute and chronic) of pioglitazone 30 mg/kg administration in the open-field test, two-way avoidance task and in the DA and metabolites levels. Acute protocol consisted in a single administration 1 hour after MPTP. Whereas, chronic protocol was performed with daily administrations starting 1 hour after MPTP and ending 22 days after that. Results showed that both

protocols were not able to reverse the cognitive impairment promoted by MPTP. We also demonstrated that acute treatment generated some level of neuroprotection, as confirmed by the absence of DA reduction in the group treated with pioglitazone in comparison to the sham group. By contrast, chronic treatment led to a reduction of striatal DA, close to MPTP. These findings suggest that acute administration of pioglitazone 30 mg/kg was more efficient in generate beneficial effects on motor behaviors and in striatal DA levels. Nevertheless, we failed to demonstrate improvements on a dopamine-related cognitive task after MPTP.

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO

A DP foi descrita pela primeira vez pelo médico britânico James Parkinson, em 1817, que a denominou de “paralisia agitante” (ANDRADE, 2005). Esta denominação permaneceu por cerca de 50 anos, quando o neurologista francês, Jean Martin Charcot, atribuiu à doença o nome de seu descritor (ANDRADE, 2005). Do ponto de vista neuroquímico, Lewy, em 1912, observou pela primeira vez inclusões citoplasmáticas nos neurônios dopaminérgicos de pacientes com DP. Tais inclusões receberam seu nome que permanece até os dias atuais (TAKAHASHI e WAKABAYASHI, 2005).

Em 1938, HASSLER observou que as lesões na parte central da zona compacta da substância negra (SN), eram as regiões mais gravemente acometidas (TAKAHASHI e WAKABAYASHI, 2005).

Greenfield e Bosanquet em 1953 relataram que a perda das células nigrais e corpúsculos de Lewy eram frequentemente encontrados em pacientes com DP. A partir desses dados, estudos subseqüentes contribuíram com informações mais detalhadas em relação à SN e corpúsculos de Lewy (TAKAHASHI e WAKABAYASHI, 2005). Neste contexto, DUFFY e TENNYSON em 1965, demonstraram pela primeira vez as características estruturais dos corpos de Lewy. Entretanto, TRETIAKOFF também parece ter participado da descoberta destas inclusões, quando observou depleção dos neurônios dopaminérgicos despigmentados, que é característica marcante da SN na DP (TAKAHASHI e WAKABAYASHI, 2005).

1.2. SINAIS E SINTOMAS DA DOENÇA DE PARKINSON

A DP trata-se da segunda doença neurodegenerativa mais comum, superada apenas pela doença de Alzheimer, acometendo 1% da população de até 65 anos e 4-5% da população com até 85 anos (BENNETT *et. al*, 1996; LANG e LOZANO, 1998).

Os sintomas da DP são aparentes somente quando ocorre perda de cerca de 60-70% dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNpc), levando a uma redução aproximada de 80% nos níveis de dopamina (DA) estriatal (JELLINGER, 1988; FAHN, 2003).

Clinicamente, a DP é caracterizada por sinais cardinais que incluem: tremor de repouso, instabilidade postural, bradicinesia e rigidez (PRZEDBORSKI, 2005).

O tremor da DP ocorre em repouso, porém diminui com movimentos voluntários e geralmente não prejudica as atividades diárias. A rigidez refere-se ao aumento do tônus muscular, sendo que, ao movimento passivo a resistência é uniforme em toda a amplitude independente da velocidade. A bradicinesia (lentificação de movimentos), a hipocinesia (redução da amplitude dos movimentos) e a acinesia (ausência de movimentos inconscientes normais, como o balançar dos braços ao caminhar), manifestam-se como uma variedade de sintomas, incluindo ausência de expressão facial normal (hipomímia), volume da voz diminuída (hipofonia), “*drooling*” que é a incapacidade de deglutição, diminuição da velocidade da escrita e do tamanho da letra (micrografia) e diminuição do tamanho dos passos durante a caminhada (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003).

Embora os sintomas motores da DP se sobressaíam em relação ao quadro clínico e também definam a síndrome parkinsoniana, muitos pacientes com DP apresentam outras queixas que foram classificadas como sintomas não motores. Esses incluem fadiga, depressão, ansiedade, distúrbios do sono, constipação intestinal e distúrbio cognitivo, que podem evoluir para demência (FAHN e SULZER, 2004). Segundo BRAAK *et al.*, em 2003, distúrbio olfatório e constipação são sintomas que aparecem na fase inicial da DP. Mais ainda, estes autores acreditam que a função olfatória está relacionada com o papel da DA estriatal.

DA CUNHA e colaboradores demonstraram em 2001, que os déficits cognitivos na DP estão provavelmente relacionados a deficiências nos processos de aquisição e retenção de memória.

A maior parte dos pacientes com DP não apresenta declínio intelectual, isso significa que a capacidade de raciocínio, percepção e julgamento encontram-se intactas. Entretanto, alguns pacientes relatam dificuldades com a memória recente, com o pensamento abstrato, dificuldades na realização de cálculos, na atenção e concentração e em atividades que requerem orientação espacial (ANDRADE, 2005).

1.3. FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

A DP consiste em uma síndrome progressiva caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos e consequente diminuição dos níveis de DA estriatais. A razão pela qual os pacientes com DP apresentam baixos níveis de DA cerebral decorre da degeneração da via nigroestriatal

dopaminérgica, cujos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos estão localizados na SNpc e a projeção de seus axônios e terminais nervosos são encontrados no estriado (PRZEDBORSKI, 2005) (vide figura 1).

Acredita-se que esta redução dopaminérgica leva à maioria dos sintomas motores da doença (HIRSCH, 2009). A degeneração desses neurônios dopaminérgicos que são ricos em neuromelanina, conduz para a despigmentação da SNpc como mostra a figura 1 (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003).

Além da neurodegeneração dopaminérgica e consequentemente a diminuição dos níveis de DA estriatais, outro achado patológico enquadrado como característica da DP é a presença de corpúsculos de Lewy, que são inclusões citoplasmáticas eosinofílicas de proteínas como parkina, ubiquitina, neurofilamentos e α -sinucleína agregadas (ERIKSEN *et al.*, 2005). Estas estruturas não são específicas para a DP, podendo ser encontradas na doença de Alzheimer, na demência com corpos de Lewy e acidentalmente em pessoas saudáveis de idade avançada (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003). Além disso, estas estruturas não estão restritas ao sistema nervoso central (SNC), mas também se encontram localizados no sistema nervoso periférico de pacientes com a doença (BLUM *et al.*, 2001).

O sistema ubiquitina-proteassoma tem sido alvo de investigações por seu papel relacionado à degradação proteica intracelular. Devido a isso, esse sistema está sendo considerado um forte candidato a desencadear processos de morte neuronal. Alterações no sistema ubiquitina-proteassoma podem levar à agregação de proteínas com alterações conformacionais, podendo potencializar a formação de corpúsculos de Lewy. Um dos primeiros locais para

a deposição de corpúsculos de Lewy na DP precoce é o bulbo olfatório. É, portanto, evidente que alterações sensoriais relacionadas ao paladar e olfato sejam muitas vezes um dos primeiros aspectos detectáveis na DP (DAVIE, 2008).

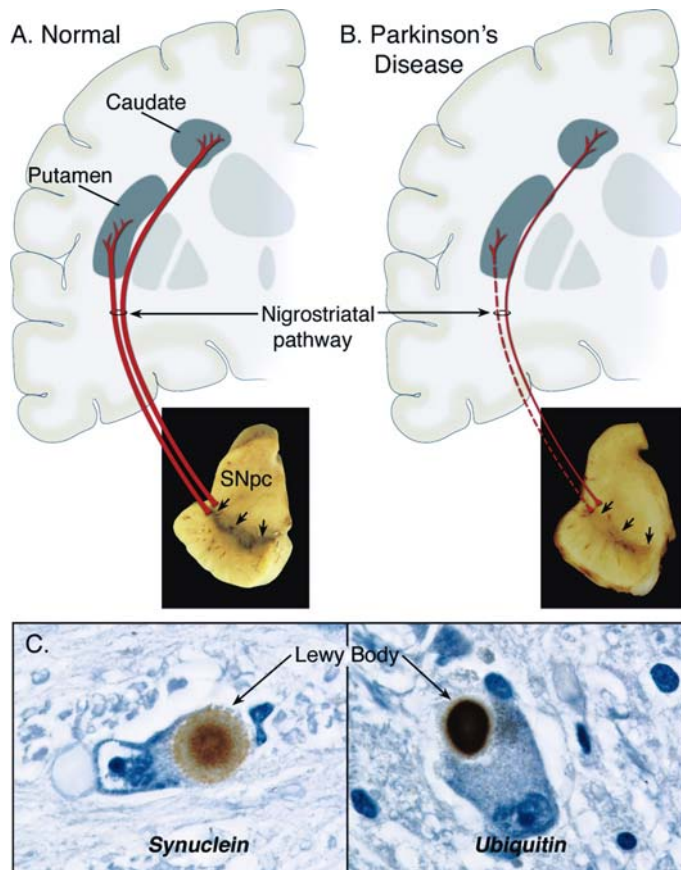


Figura 1: Representação esquemática da via nigroestriatal normal (A) e da via nigroestriatal na DP (B). A figura C representa a imunohistoquímica demonstrando inclusões intracelulares (corpúsculos de Lewy) nos neurônios dopaminérgicos na SNpc. Figura retirada de: DAUER E PRZEDORSKI, 2003.

1.4. ETIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

Ainda permanece desconhecida a causa da DP, porém acredita-se na ocorrência de diversos fatores relacionados à origem da doença, que incluem: alterações genéticas, fatores ambientais, excitotoxicidade, neuroinflamação e estresse oxidativo (PRZEDBORSKI, 2005).

1.4.1. Alterações genéticas

Embora a DP seja capaz, em alguns casos, de ocorrer devido a mutações genéticas, esta forma da doença ainda fica restrita a um número muito pequeno de casos. Acredita-se, hoje em dia, que a susceptibilidade genética associada a uma exposição ambiental a toxinas leve ao desenvolvimento da DP (RIEDER *et al.*, 2004).

Até o momento, 11 genes foram mapeados sendo que seis deles estão implicados diretamente com eventos que levam a doença (DAVIE *et al.*, 2008). A identificação da *α -sinucleína* como o primeiro gene responsável pela DP herdada foi o ponto inicial para estudos definindo um papel geral dessa proteína na neurodegeneração (SPILLANTINI *et al.*, 1997; RIESS *et al.*, 2006).

No entanto, postula-se que apenas 10% dos casos estejam relacionados à DP familiar, enquanto os outros 90% sejam casos de DP idiopática, assim, alguns autores sugerem que indivíduos parkinsonianos com idade inferior a 50 anos sejam mais suscetíveis a desenvolver a doença por alterações genéticas (TANNER *et al.*, 1999).

1.4.2. Fatores ambientais

Acredita-se que a interação entre predisposição genética e os fatores ambientais podem provocar disfunção mitocondrial e dano oxidativo na DP esporádica (DRECHSEL e PATEL, 2008).

A exposição a pesticidas tem recebido atenção devido às implicações do uso generalizado destes agentes em saúde pública. Um detalhado estudo da literatura epidemiológica e toxicológica sugere uma forte correlação entre a exposição prolongada a pesticidas e DP (DRECHSEL e PATEL, 2008).

Recentemente, o uso de pesticidas baseados em modelos animais de DP torna-se cada vez mais popular e forneceu informações valiosas sobre o processo neurodegenerativo (DRECHSEL e PATEL, 2008).

O MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) é o modelo animal mais utilizado, que causa toxicidade em ratos, e a exposição em humanos leva a uma síndrome que mimetiza os sintomas neurológicos da DP e neurodegeneração dopaminérgica (DAUER, *et. al*, 2003).

Neurotoxinas, como 6-hidroxidopamina (6-OHDA), também são amplamente utilizadas como modelos animais de DP. Além disso, tem sido relatado que os produtos químicos agrícolas, como a rotenona, paraquat ou manebe podem induzir processos de neurotoxicidade, dependendo da dose e do nível de exposição, quando de sua exposição sistêmica. Um mecanismo de ação neurotóxico comum a esses compostos é dado pela inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (GREENAMYRE, 2001).

LANDRIGAN e colaboradores, em 2005, sugeriram que além dessas toxinas, a exposição crônica a elevados níveis de manganês pode resultar no acúmulo deste metal nos gânglios da base gerando o chamado manganismo, que leva sintomas como rigidez, tremores e psicose.

1.4.3. Disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e excitotoxicidade

Excitotoxicidade, fosforilação oxidativa, neuroinflamação, produção de espécies reativas de oxigênio e apoptose são discutidas como importantes mediadores de morte celular (DEHMER, 2004). Alterações no complexo I da cadeia respiratória mitocondrial podem contribuir para a degeneração celular neuronal em decorrência do declínio na síntese de ATP. Muitas toxinas ambientais podem afetar a função mitocondrial. A toxicidade de muitos pesticidas como a rotenona, assim como do MPTP podem inibir a função do complexo I, levando ao bloqueio da atividade da cadeia transportadora de elétrons, e por fim, a falha da transdução de energia (CHEN e LE, 2006).

A DA, intracelularmente, pode ser degradada tanto pela enzima monoamina oxidase A (MAO-A) (GOTZ *et al.*, 1994) quanto por auto-oxidação. Quando a dopamina é metabolizada pela monoamina oxidase B (MAO-B), ocorre formação do ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) onde há o consumo de oxigênio e água (GESI *et al.*, 2001). A auto-oxidação intracelular da DA leva à produção de H_2O_2 e DA-quinona (SULZER & ZECCA, 2000), conduzindo a uma diminuição dos níveis de glutathione peroxidase, que é a enzima anti-oxidante. Logo, a DA-quinona inibe a função do transportador de DA nos sinaptossomas (BERMAN & HASTINGS,

1997), que por sua vez inibe a enzima tirosina hidroxilase (TH) (KUHN *et al.*, 1999) e leva a uma síntese incompleta de ATP (BERMAN & HASTINGS, 1999). A diferença entre a glutatona reduzida e a glutatona oxidada (GSH/GSSG) é diminuída durante a degeneração, proporcionando, então, a formação de mais radicais livres (SIAN *et al.*, 1994; SOFIC *et al.*, 1992).

Acredita-se, então, que o dano oxidativo aos neurônios dopaminérgicos da SN seja uma das principais causas da neurodegeneração na DP. Assim, compostos antioxidantes podem ser extremamente importantes na prevenção da doença. Alguns estudos (IACOVITTI *et al.*, 1999) demonstraram que os antioxidantes podem proteger os neurônios da morte celular resultante do estresse oxidativo por inibição da conversão do MPTP em MPP⁺ (HSU *et al.*, 2000).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC, onde atua sobre receptores ionotrópicos (N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido α -amino-3-hidroxi-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA)) ou receptores metabotrópicos (mGlu1-mGlu8) (DINGLELINE *et al.*, 1999; GREENAMYRE *et al.*, 1994). Assim, a excitotoxicidade é outro evento potencialmente fatal para os neurônios dopaminérgicos, que se refere à morte celular neuronal causada pela ativação excessiva de aminoácidos excitatórios por agonistas de receptores de glutamato (WATKINS e OLVERMAN, 1987). Isso poderia mudar a permeabilidade celular aos íons Ca^{2+} devido sua ligação aos receptores NMDA que têm um importante papel na progressão da DP. A ativação dos receptores NMDA é capaz de levar a formação excessiva de óxido nítrico (NO), resultando em neurotoxicidade. Baseado neste conceito, muitos antagonistas dos receptores NMDA, que podem inibir a atividade do glutamato dependente

do receptor, ou inibidores do glutamato, possivelmente protegem os neurônios dopaminérgicos contra a lesão induzida pela excitotoxicidade (CHEN e LE, 2006).

Os radicais livres produzidos como resultado da ativação de enzimas cálcio dependentes, como a fosfolipase A2, óxido nítrico sintase (NOS), xantina peroxidase e disfunção mitocondrial podem conduzir para a morte celular (DOBLE, 1999). Este mesmo autor sugere que a hipóxia pode estimular a liberação de ácido glutâmico, e através dos receptores NMDA, mata a célula por excitotoxicidade, uma vez que resultados obtidos *in vitro* demonstram que a morte celular das culturas celulares submetidas à hipóxia pode ser bloqueada pelo aumento das concentrações de magnésio no meio extracelular, antagonistas de receptores NMDA ou drogas que inibem a liberação de glutamato como o riluzol.

Conforme EMERIT *et al.*, (2004), a concentração de glutamato nos neurônios glutamatérgicos é menor no meio extracelular quando comparada com o meio intracelular. Quando há aumento excessivo dos níveis de glutamato extracelular, ocorre dano neuronal.

1.4.4. Neuroniflamação e DP

Recentemente, muitos trabalhos têm sugerido que os processos de uma reação inflamatória e glial podem participar da cascata de eventos que levam a degeneração neuronal. Várias linhas de pesquisas apoiam essa hipótese. Em primeiro lugar, uma reação astrocitária é geralmente descrita no exame neuropatológico na SN de pacientes com DP e foi confirmada

quantitativamente realizando a imunohistoquímica da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (DAMIER *et al.*, 1993). Um número maior de células da micróglia ativada tem sido insistentemente relatado na DP (BANATI *et al.*, 1998; MCGEER *et al.*, 1988), porém o papel desempenhado por estas células da glia não é completamente compreendido. Alguns astrócitos podem desempenhar um papel neuroprotetor por “limpeza” dos radicais livres de oxigênio (DAMIER *et al.*, 1993) e produção de fatores neurotróficos conhecidos por protegerem os neurônios contra vários insultos dopaminérgicos (PARAIN *et al.*, 1999; MAYER *et al.*, 1993). Por outro lado, células ativadas da micróglia podem ter um efeito deletério sobre os neurônios dopaminérgicos (CROSS e WOODROOFE, 2001).

Deve-se enfatizar que estas alterações não são específicas para a DP, pois processos neuroinflamatórios contribuem para muitos distúrbios neurodegenerativos como doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e paralisia supranuclear progressiva (HIRSCH e HUNOT, 2009).

A ativação da micróglia em resposta à lesão, está associada com um aumento da expressão da enzima iNOS resultando em elevação da produção de NO. Neste sentido, o aumento da imunomarcagem para iNOS tem sido detectado na SNpc de encéfalos de pacientes com DP, sugerindo que as espécies reativas de oxigênio (ROS) também podem desempenhar um papel crítico na doença (PATEL *et al.*, 2008). Embora esses estudos demonstrem um dano neuronal envolvido na DP, existe um intenso debate questionando se estes eventos são primários ou secundários no mecanismo da patogenia da doença (PATEL *et al.*, 2008).

Processos inflamatórios associados com um aumento na expressão da enzima ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) e elevadas concentrações de prostaglandina E2 (PGE2) estão implicadas na cascata de eventos deletérios levando a neurodegeneração. A expressão de COX-2 tem sido mostrada especificamente em neurônios dopaminérgicos da SNpc de humanos com DP *post mortem*, e no modelo do MPTP durante a destruição da via nigroestriatal (LIMA *et al.*, 2006). A COX-2 é fortemente relacionada com eventos de neurodegeneração e na estimulação de um processo inflamatório seguido de morte neuronal. Tem-se demonstrado que a expressão da COX-2 em neurônios está correlacionada com a apoptose dos mesmos e está envolvida na resposta neuronal ao estresse (REKSIDLER *et al.*, 2007). O aumento da expressão e da atividade da COX-2 aparece logo após o início do processo, e conta, em parte, com o acúmulo dos mediadores oxidativos nesta condição. A inibição da COX-2 apenas, ou da COX-1 e COX-2 por drogas antiinflamatórias esteroidais seletivas ou não seletivas, em modelos de lesões neuronais, tem sido mostrada como uma estratégia de neuroproteção (REKSIDLER *et al.*, 2007).

1.5. MODELOS ANIMAIS NA DP

Vários modelos animais têm sido desenvolvidos para estudar o mecanismo e a intervenção terapêutica da DP, são eles: MPTP, paraquat e manebe (PATEL *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2007; THIRUCHELVAM *et al.*, 2000; CORY-SLECHTA *et al.*, 2005)

Neurotoxinas como a 6-hidroxidopamina (6-HODA) ou MPTP são amplamente utilizadas como modelos animais da DP (Schober, 2004). Além disso, tem-se relatado que os produtos químicos agrícolas como a rotenona, paraquat ou manebe induzem algumas características específicas da DP quando administradas sistemicamente (GREENAMYRE *et al.*, 2001). Um mecanismo comum destes compostos é que ambos interferem no complexo I da cadeia mitocondrial dos neurônios nigrais (MCNAUGHT e OLANOW, 2006). Estas toxinas provocam a morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc, por vários mecanismos e suas similaridades e diferenças tem provido envolvimento nos possíveis mecanismos da neurodegeneração relatada na DP (PATEL, 2008).

1.5.1. 6-OHDA

Toxina introduzida há 42 anos, foi o primeiro modelo animal associado com a morte de neurônios dopaminérgicos na DP (LUTHMAN *et al.*, 1989, DAUER *et al.*, 2003). A perda maior de neurônios dopaminérgicos é observada na região ventral do mesencéfalo (JONSSON, 1980; DAUER *et al.*, 2003). A 6-OHDA gera produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inativa macromoléculas biológicas pela geração de quinonas (COHEN e WERNER, 1994; DAUER, *et al.*, 2003). A neurotoxina, 6-OHDA, é estruturalmente semelhante à DA e norepinefrina e possui uma elevada afinidade pelos transportadores da membrana plasmática destas catecolaminas (BREESE e TRAYLOR, 1971; MEREDITH *et al.*, 2008). Uma vez dentro dos neurônios, é

facilmente oxidada e produz H_2O_2 e paraquinona, ambos os quais são altamente tóxicos (SONNIER *et al.*, 2007; MEREDITH *et al.*, 2008). O grau de perda de neurônios dopaminérgicos e seus terminais estriatais é dependente da localização e da dose da toxina, bem como o tempo de duração da lesão. No entanto, esta toxina não leva a produção de corpos de Lewy (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; LANE e DUNNETT, 2007, MEREDITH *et al.*, 2008).

A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE), portanto deve ser administrada localmente através de injeção estereotáxica, diretamente na SNpc, ou no feixe prosencefálico medial, o qual conduz projeções ascendentes dopaminérgicas e serotoninérgicas ao encéfalo ou ao estriado, que é a via dopaminérgica nigroestriatal. Além disso, a 6-OHDA também pode ser administrada diretamente no estriado. Após a introdução da toxina na SNpc ou no feixe prosencefálico medial, os neurônios dopaminérgicos começam a se degenerar em 24 horas, e não se observa morfologia apoptótica. Quando injetada no estriado, a 6-OHDA causa uma degeneração mais retrógrada de neurônios nigroestriatais que dura cerca de uma a três semanas. Entretanto, essa toxina não leva à formação de corpúsculos de Lewy. (DAUER, *et al.*, 2003).

1.5.2. Paraquat

Outras toxinas ambientais conhecidas, por interromper a respiração mitocondrial e produzir ROS, têm sido administradas sistemicamente para induzir DP em animais (PRZEDBORSKI e ISCHIROPOULOS, 2005; MEREDITH *et al.*, 2008). Entre elas está o paraquat, um herbicida que

atravessa a BHE e depois de algumas reações, leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente H₂O₂ e radical hidroxila, conduzindo a conseqüentes efeitos celulares deletérios.

Diversos estudos demonstram perdas significativas de neurônios dopaminérgicos na SNpc com o paraquat (BROOKS *et al.*, 1999; FLEMING *et al.*, 2004; KUTER *et al.*, 2007; MCCORMACK *et al.*, 2002; PENG *et al.*, 2005; MEREDITH *et al.*, 2008) e um aumento de expressão e agregação da α -sinucleína (FERNAGUT *et al.*, 2007; MANNING-BOG *et al.*, 2002; MEREDITH *et al.*, 2008).

O manebe etilenobisditiocarbamato (manganês) é um fungicida que inibe o transporte de glutamato e interrompe a captação e liberação de DA (VACCARI *et al.*, 1998; VACCARI *et al.*, 1996; MEREDITH *et al.*, 2008) é geralmente co-administrado com o paraquat para aumentar a toxicidade. Quando combinado com manebe 30 mg/kg, paraquat (10 mg/kg) em 1-2 injeções por semana (3-6 semanas), essa associação destrói 50% de neurônios dopaminérgicos da SNpc em camundongos jovens (THIRUCHELVAM *et al.*, 2002; MEREDITH *et al.*, 2008). Em camundongos velhos (18 meses de idade), o tratamento com manebe combinado com o paraquat, produziu uma perda progressiva de células dopaminérgicas, ou seja, aproximadamente 75% em duas semanas e 88% em 12 semanas (THIRUCHELVAM *et al.*, 2003; MEREDITH *et al.*, 2008). Estudos em ratos velhos têm mostrado que eles são muito sensíveis aos efeitos tóxicos da combinação paraquat / manebe nas mesmas doses utilizadas em ratos jovens (MEREDITH *et al.*, 2008).

Além destes, outros modelos animais são utilizados para induzir DP em animais, como o da rotenona.

1.5.3. Rotenona

É o mais potente membro dos rotenoides, uma família de compostos citotóxicos naturais extraídos de plantas tropicais, foi amplamente utilizado como inseticida e veneno para peixes. É altamente lipofílico e tem rápido acesso a todos os órgãos (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003).

Baixas doses de rotenona administrada endovenosamente, levam a neurodegeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, a presença de α -sinucleína positiva e corpos de Lewy. Acredita-se que os neurônios dopaminérgicos são preferencialmente sensíveis à inibição do complexo I, pois a rotenona é capaz de entrar livremente nas células. Animais intoxicados por ela desenvolvem postura anormal e diminuição de movimento, porém não se conhece qual dessas características melhora com a administração de levodopa (DAUER *et.al*, 2003).

A neurodegeneração dopaminérgica, acompanhada pela formação de agregados como corpúsculos de Lewy nesse modelo, pode contribuir para o desenvolvimento de novos experimentos, a fim de explorar a relação entre a formação de agregados e morte neuronal (DAUER *et.al*, 2003).

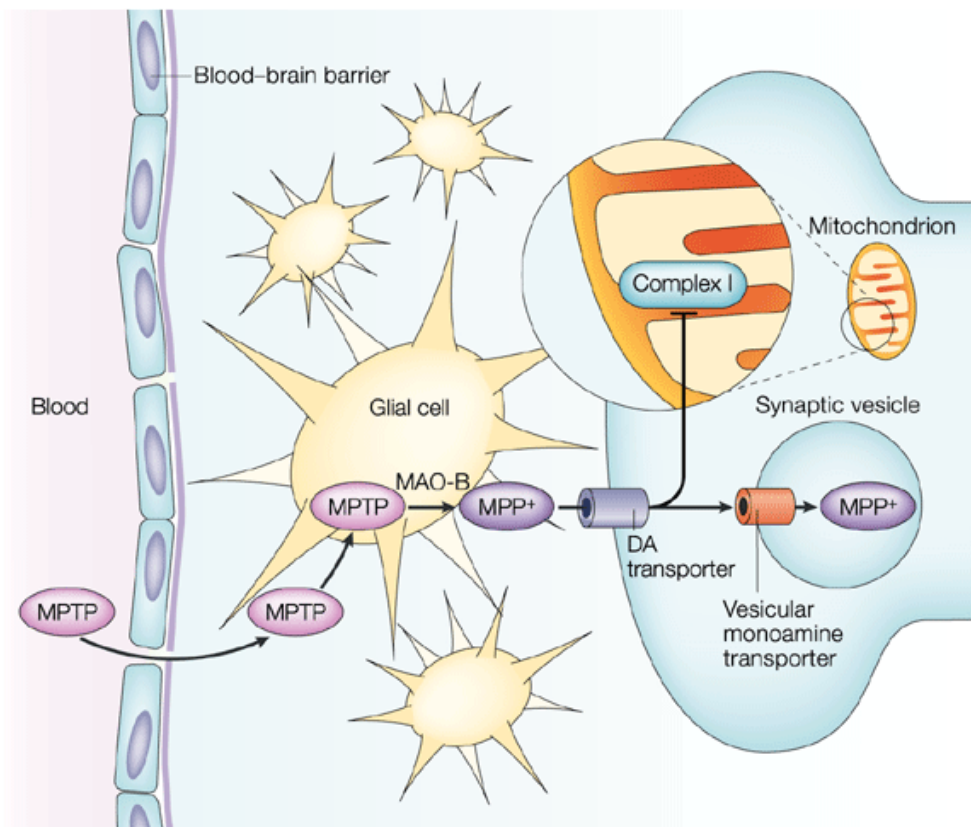
1.5.4. MPTP

Em 1982, um grupo de estudantes da Califórnia (EUA) costumava fazer uso de drogas constantemente (normalmente derivados sintéticos da heroína), e após certo tempo, esses estudantes desenvolveram um quadro de parkinsonismo (MENESES e TEIVE, 2003). Após sua morte, o estudo dos tecidos cerebrais revelou a degeneração de neurônios dopaminérgicos. E o estudo do narcótico utilizado mostrou a presença de MPTP (MENESES e TEIVE, 2003; PETZINGER *et al.*, 2007). Embora o risco da exposição humana a este composto sintético é limitada, o MPTP tem sido fundamental para a compreensão dos mecanismos que levam à neurodegeneração dopaminérgica (PATEL *et al.*, 2008).

O MPTP é um produto da síntese química de um análogo da meperidina com potentes efeitos como os da heroína. O MPTP pode induzir a uma síndrome parkinsoniana em humanos e primatas não humanos, quase indistinguívelmente da DP, tanto do ponto de vista clínico quanto do neuropatológico (LANGSTON e IRWIN, 1986).

O MPTP é uma molécula altamente lipofílica (RIACHI *et al.*, 1989), que atravessa facilmente as membranas lipídicas. Portanto, não é surpreendente que ele atravesse a BHE em questão de segundos após sua administração sistêmica (MARKEY *et al.*, 1984). Uma vez no encéfalo, ele é rapidamente convertido em 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP^+), o metabólito ativo do MPTP (HEIKKILA *et al.*, 1984). A transformação do MPTP para MPP^+ é um processo de duas fases. Primeiramente o MPTP sofre a ação da enzima monoamina oxidase B (MAO-B), originando o 1-metil-2-fenil-2,3-dihidropiridinium ($MPDP^+$)

(CHIBA *et al.*, 1984). Esta conversão ocorre especificamente na glia e células serotoninérgicas, e não em neurônios dopaminérgicos. Uma vez formado, o MPP⁺ é liberado dessas células para o espaço extracelular a fim de entrar nos neurônios dopaminérgicos (RIACHI *et al.*, 1989). Numa segunda fase, o MPP⁺ adentra nos neurônios dopaminérgicos através dos transportadores de DA, pelos quais ele tem alta afinidade (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003), como mostra a figura 2. Uma vez dentro destes neurônios, o MPP⁺ rapidamente acumula-se na matriz mitocondrial (RAMSAY *et al.*, 1986; RAMSAY e SINGER, 1986), e expulsa a DA de dentro das vesículas, havendo um acúmulo então de DA no citosol. O excesso de DA citosólica pode sofrer ação de enzimas, como a COX-2, presente nos neurônios dopaminérgicos da SN, e gerar a formação de DA-quinona. Também, esse aumento de DA no citosol neuronal pode aumentar a formação de neuromelanina, implicando em um importante aumento na susceptibilidade à morte neuronal. Está bem estabelecido que o MPP⁺ intramitocondrial inibe a fosforilação oxidativa (SINGER *et al.*, 1987). O MPP⁺ está concentrado nos neurônios monoaminérgicos e produz alterações bioquímicas nestes, mas a degeneração é mais acentuada em neurônios dopaminérgicos. (DAUER *et. al*, 2003).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 2: Mecanismo de ação do MPTP.

FONTE: VILA e PRZEDBORSKI, 2003

1.6. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DP

Não existe cura para a DP, uma vez que as terapias disponíveis atualmente não podem interromper a progressão da doença. Entretanto, os sintomas podem ser controlados com a administração de várias drogas distintas, as quais aumentam os níveis de DA no encéfalo ou mimetizam os efeitos desse neurotransmissor (SINGH, *et al*, 2007).

A maioria dos pacientes que iniciam o tratamento da DP apenas com agonista dos receptores da DA, normalmente, dentro de alguns anos, terão de fazer uso de levodopa ou L-dopa que é uma droga precursora da DA. Para minimizar os efeitos colaterais, inicialmente são administradas pequenas doses de levodopa, que gradualmente vão sendo aumentadas. Além da levodopa outras classes são utilizadas para tratar a DP, como: inibidores da catecol-o-metiltransferase (COMT), agonistas dos receptores de DA, inibidores da MAO-B, amantadina entre outros. Apesar desses tratamentos disponíveis atualmente no mercado, eles têm utilidade somente para alívio dos sintomas da doença. O ideal seria a disponibilidade de drogas que possibilitassem a reversão da neurodegeneração dopaminérgica na DP, que infelizmente ainda não foi possível. Baseado nessa ideia e em dados disponíveis na literatura, nós utilizamos a pioglitazona, um medicamento antidiabético empregado no tratamento do diabetes mellitus do tipo 2, que possui propriedades antiinflamatórias. Assim, a pioglitazona foi administrada oralmente em ratos tornados parkinsonianos, após infusão de MPTP intranigral.

1.7. NOVAS ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS PARA A DP: POSSÍVEL PAPEL DAS GLITAZONAS NA NEUROPROTEÇÃO DOPAMINÉRGICA

No diabetes mellitus do tipo 2 ocorre uma resistência à ação da insulina (DE FRONZO, 2004) que é caracterizada pela diminuição da capacidade da insulina em estimular a utilização da glicose pelo músculo e tecido adiposo (SKYLER, 2004).

As tiazolidinedionas (TZDs) ou glitazonas representam uma classe de agentes que aumentam a sensibilidade à insulina que demonstraram eficácia no tratamento de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2. As TZDs iniciam sua ação por ligação a um receptor nuclear específico denominado receptor gamma ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR γ), e sua afinidade de ligação ao PPAR γ está intimamente relacionada com o seu efeito anti-hiperglicemiante (MIYAZAKI *et al*, 2005).

Existem três diferentes isoformas para os PPARs: PPAR γ , PPAR α e PPAR δ ou β . A maioria das funções bioquímicas atribuídas aos PPARs exige que o receptor, após ser ativado pela ligação de um agonista, forme um complexo heterodímero com um receptor retinoide X (RXR), que é o receptor do ácido retinoico, outro membro da superfamília dos receptores nucleares. Em seguida este heterodímero se liga aos elementos responsivos proliferadores de peroxissoma (PPREs) na região promotora de genes regulados por ele (HUNTER e BING, 2007) (ver figura 3). Na ausência de ligantes, estes heterodímeros são fisicamente associados com complexos co-repressores ocorrendo supressão da transcrição dos genes codificados pelos PPARs. Entretanto, quando ocorre a ligação do ligante ao receptor, os complexos contendo co-repressor N-Cor (co-repressor do receptor nuclear) são descartados e são substituídos com complexos de co-ativador. Estes co-ativadores são então ligados ao ribossomo, ativando a transcrição destes genes (HENEKA *et al.*, 2007).

Os agonistas endógenos do PPAR γ incluem ácidos graxos, como a prostaglandina J2. As glitazonas (ciglitazona, troglitazona, rosiglitazona e pioglitazona) são os agonistas sintéticos deste receptor (PARK *et al.*, 2006).

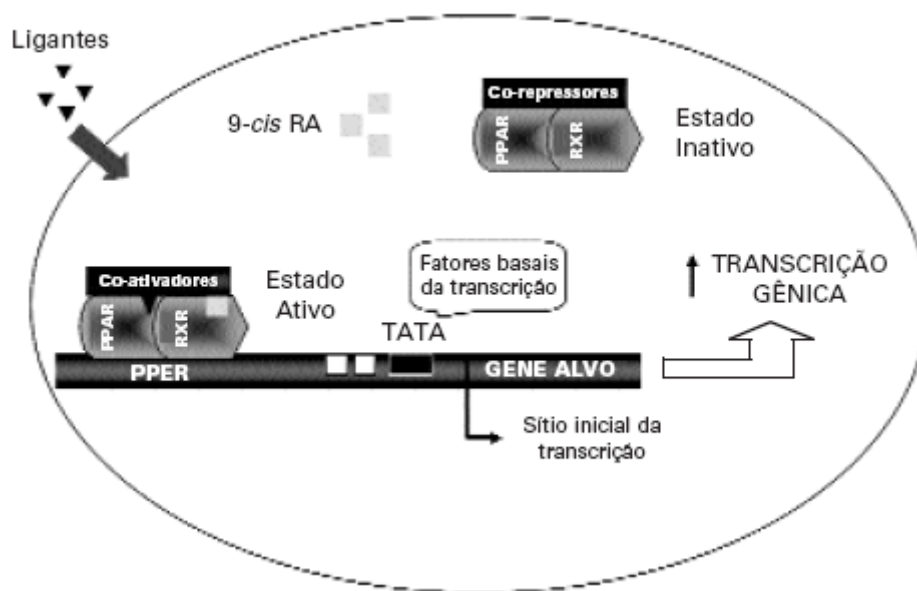


Figura 3. Mecanismo de ativação transcricional pelo PPAR: Requer a liberação do complexo co-repressor feito por um ligante, e o recrutamento de complexo co-ativador. O complexo PPAR:RXR ativado liga-se ao PPRE, produzindo alteração na estrutura da cromatina, originando uma estrutura transcricionalmente competente (Tavares, 2007).

O NF- κ B (fator nuclear kappa B) é um heterodímero encontrado no citoplasma das células, na sua forma inativa, composto por duas subunidades: p50 e p65, que é ativado pela eliminação de uma proteína inibitória, chamada I κ B α que regula a ativação do NF- κ B. Para que o NF- κ B seja ativado e então dê início à transcrição de genes pró-inflamatórios, ele deve sofrer translocação do citoplasma para dentro do núcleo, e é a I κ B α que regula esta migração. A

eliminação da I κ B α ocorre devido a fosforilação de algumas de suas serinas (posições 32 e 36) seguida pela poliubiquitinação e degradação proteassômica (DEHMER *et al.*, 2004).

Os agonistas do PPAR γ inibem a atividade transcricional da subunidade p65 do NF- κ B interferindo com a via sinalizadora do NF κ B, que tem sido implicada na patogênese da DP. Outros estudos mostraram a supressão da expressão de iNOS na micróglia por interferência com a atividade transcricional do NF- κ B no núcleo. Além disso, o tratamento com agonistas do PPAR γ pode induzir à expressão de I κ B α que é acompanhado por uma diminuição na atividade de ligação do DNA com o NF- κ B, sugerindo outro mecanismo para a atividade antiinflamatória dos ligantes do PPAR (DEHMER *et al.*, 2004).

Além dos mecanismos acima descritos atribuídos aos ligantes do PPAR γ , HUNTER e colaboradores (2007), descreveram que a ativação deste receptor pode regular a resposta inflamatória e diminuir a expressão da COX-2, enzima que se encontra aumentada na SNpc de ratos lesados com MPTP horas após a sua infusão. Segundo estudo prévio realizado por nosso grupo verificou-se o envolvimento do processo inflamatório na morte neuronal dopaminérgica (LIMA *et al.*, 2006). Considerando que a pioglitazona apresenta efeito antiinflamatório, considera-se que esta droga pode causar neuroproteção por inibir a COX-2.

Muitos estudos têm demonstrado efeitos benéficos dos agonistas do PPAR γ em modelos animais, e muitos destes dados relevantes da literatura foram concluídos a partir do tratamento crônico com a pioglitazona que se deu início antes da infusão do MPTP. Assim, DEHMER *et al.*, em 2004 verificaram

que houve uma redução da ativação da micróglia, indução reduzida de células positivas para iNOS e redução da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no estriado e na SNpc, em ratos que receberam tratamento prolongado com pioglitazona. Além disso, o tratamento com pioglitazona protegeu completamente da perda dos neurônios positivos para TH. Em outro estudo de BREIDERT e colaboradores em 2002, demonstrou-se resultados semelhantes aos apresentados por DEHMER e colegas, no tratamento crônico com a pioglitazona oral, ou seja, significativa redução da micróglia e que o tratamento também iniciou-se antes da administração da toxina MPTP.

Conforme esses e outros dados, realizamos nossos experimentos administrando a pioglitazona após a infusão do MPTP intranigral. Considerando que QUINN *et al.*, recentemente, em 2008, trouxeram dados surpreendentes de que a pioglitazona inibe a MAO-B, enzima necessária para a transformação do MPTP em seu metabólito ativo, MPP+. Portanto, nosso objetivo no trabalho foi demonstrar que a pioglitazona pode ter sido capaz de reverter a atividade do MPTP e não impedido a sua metabolização, já que esta foi administrada após o início dos danos causados pela toxina.

Segundo alguns autores, os pacientes com DP apresentam prejuízo cognitivo, mesmo quando a degeneração nigroestriatal não é suficiente para desencadear os danos motores (LINDNER *et al.*, 1999). Sabemos que o modelo animal de parkinsonismo induzido por MPTP exhibe vantagens no estudo da DP por reproduzir prejuízos cognitivos evidenciados nos estágios iniciais da doença (DA CUNHA *et al.*, 2001; FERRO *et al.*, 2005). A partir disso, já foi demonstrado que animais lesados com MPTP apresentam

comprometimento de aprendizado e memória demonstrados na realização de alguns testes como esquiva ativa de duas vias (PERRY *et al.*, 2004).

Baseado nesses dados e nos resultados de KUMAR e colaboradores em 2009, que demonstraram melhora na cognição dos animais através da esquiva passiva e outros testes comportamentais, após tratamento oral crônico com pioglitazona e infusão de MPTP, nós utilizamos o mesmo modelo animal e o tratamento oral com pioglitazona, e posteriormente realizamos o teste da esquiva ativa de duas vias, a fim de uma análise em relação ao aprendizado e memória destes animais lesados pela neurotoxina.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a existência de um possível efeito neuroprotetor sobre o sistema dopaminérgico nigroestriatal, promovido pelos tratamentos agudo e crônico com pioglitazona, utilizando o modelo animal da DP induzido por MPTP em ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade motora dos animais tratados agudamente com diferentes doses de pioglitazona oral (5 15 e 30mg/kg) frente à lesão neuronal gerada pela administração intranigral de MPTP em ratos.
- Investigar os parâmetros cognitivos dos animais que receberam tratamento agudo e crônico com pioglitazona oral frente à lesão neuronal gerada pela administração intranigral de MPTP em ratos.
- Avaliação neuroquímica dos ratos que receberam pioglitazona oral aguda e cronicamente após infusão bilateral intranigral de MPTP.

Acute but not chronic administration of pioglitazone promoted behavioral and
neurochemical protective effects in the MPTP model of Parkinson's disease

Running title: Acute but not chronic pioglitazone promoted protective effects in
a model of PD

Janaína Barbiero, Ronise M. Santiago, Marcelo M. S. Lima✉, Deborah Ariza,
Livia H. Moraes, Roberto Andreatini, Maria A. B. F. Vital

Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central.
Departamento de Farmacologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

✉ *Corresponding author:*

Marcelo M. S. Lima, PhD
Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Farmacologia
Av. Francisco H. dos Santos s/n
CEP: 81.531 - 990

Curitiba – Paraná – Brasil

FAX number: 0055-041-3266 2042

Phone number: 0055-041-3361 1717

E-mails: mmeirasantoslima@yahoo.com.br or mmslima@ufpr.br

Number of pages: 31

Number of figures: 4

Number of tables: 1

Abstract

The present study investigated the neurochemical, motor and cognitive effects of pioglitazone in a rat model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). In the first experiment, we administered MPTP, and 1 h later administered a single oral dose of pioglitazone (5, 15 and 30 mg/kg). The following day, we performed the open-field test and neurochemical dose response curve. We demonstrate that 30 mg/kg of pioglitazone was capable of restoring striatal dopamine (DA) concentrations and motor behaviors. A second experiment was conducted to test the effects of two protocols (acute and chronic) of pioglitazone (30 mg/kg) administration in the open-field test, two-way active avoidance task and in the DA and metabolites levels. The acute protocol consisted of a single oral administration 1 hour after MPTP, whereas the chronic protocol was performed with daily administrations starting 1 hour after MPTP and ending 22 days after that. Results showed that neither protocol were able to reverse the cognitive impairment promoted by MPTP. We also demonstrated that acute treatment generated some level of neuroprotection, as confirmed by the absence of DA reduction in the group treated with pioglitazone in comparison to the sham group. By contrast, chronic treatment led to a reduction of striatal DA, close to MPTP administration alone. These findings suggest that acute administration of pioglitazone (30 mg/kg) was more efficient in generating beneficial effects on motor behaviors and in striatal DA levels. Nevertheless, we failed to demonstrate that pioglitazone administration improved performance on a dopamine-related cognitive task after MPTP.

Keywords: Parkinson's disease, dopamine, pioglitazone, neuroprotection, PPAR- γ

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder, after Alzheimer's disease, affecting 1% of the population by the age of 65 years and 4-5% of the population by the age of 85 years [1,2]. The pathological hallmark of idiopathic PD is the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Excitotoxicity, oxidative phosphorylation, neuroinflammation, the production of reactive oxygen species and apoptosis are thought to be important cell death mediators in PD [3]. Insights into the pathogenesis of PD have been achieved experimentally by using the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). When exposed to MPTP, monoamine oxidase-B (MAO-B) in glial cells converts MPTP to 1-methyl-4-phenylpyridium, which goes inside the dopaminergic neurons via the dopamine (DA) transporter and inhibits the complex I in mitochondria [4]. This leads to a decrease in ATP levels, oxidative stress, dopaminergic neuronal death, neurochemical disruption and motor and cognitive impairments [5]. A well known model to study the early phase of PD is accomplished through bilateral injections of MPTP in the SNpc which results in cognitive dysfunction, mild motor impairment, sleep disruptions and lesions of the SNpc [5-14].

We and others have previously shown that anti-inflammatory drugs, particularly the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors, demonstrate important neuroprotective effects in the MPTP model of PD [15-18]. Recently, studies focusing on agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) showed similar neuroprotective effects, mainly involving anti-

inflammatory and anti-oxidative properties unleashed by PPAR- γ 's activation [19,3,15,20]. PPAR- γ is one isoform of the PPARs family, which is found to be highly expressed in various brain regions including the striatum, SNpc, cortex and hippocampus [21]. In addition, PPAR- γ agonists, like pioglitazone, have been shown to attenuate dopaminergic neuronal damage, possibly due to mechanisms involving decreases in the inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and inhibition of MAO-B activity [3,20]. More recently, one study demonstrated a beneficial effect of pioglitazone in cognitive functions after performing intranigral MPTP injections [22].

To improve on the current understanding of the pioglitazone neuroprotective mechanisms and to elucidate the neurochemical, cognitive and locomotor behavioral alterations involved in this degeneration, we initially analyzed different dosages of pioglitazone in order to establish a more adequate dose able to produce neuroprotective effects in the intranigral MPTP model of PD. In a second set of experiments, we employed this dose of pioglitazone in two different administration protocols, acute and chronic, with the purpose of compare the effectiveness of pioglitazone to reverse locomotor, cognitive and neurochemical deficits elicited by intranigral MPTP.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats from our breeding colony weighing 280–320 g at the beginning of the experiments were used. The animals were randomly housed in

groups of five in polypropylene cages with wood shavings as bedding and maintained in a temperature-controlled room ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) on a 12-h light-dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). The animals had free access to water and food throughout the experiment. The studies were carried out in accordance with the guidelines of the Committee on the Care and Use of Laboratory Animals, United States National Institutes of Health. In addition, the protocol complies with the recommendations of Federal University of Paraná and was approved by the Institutional Ethics Committee (protocol # 141).

2.2. Stereotaxic Surgery

Intranigral MPTP administration was done according to our standard protocol [11]. All the rats received atropine sulfate (0.4 mg/kg, intraperitoneal) and penicillin G-procaine (20.000 U in 0.1 mL, intramuscular) and were anesthetized with equitesin (chlornembutal, 0.3 ml/kg, intraperitoneal). Bilateral infusions of MPTP-HCl (100 μg in 1 μL of sterile saline 0.9%) were performed through a 27-gauge stainless steel needle, using a 10 μL syringe (Hamilton, NV, USA) according to the following coordinates: anteroposterior (AP): -5.0 mm from the bregma; mediolateral (ML): ± 2.1 mm from the midline; dorsoventral (DV): 8.0 mm from the skull [23]. The control of the flow of each injection was made by using an electronic pump (Harvard Apparatus, USA) at a rate of 0.33 $\mu\text{L}/\text{min}$, for 3 min, followed by 2 min with the needle in the injection site to avoid reflux. Sham operations followed the same procedure, but sterile saline 0.9% was injected instead.

2.3. Pioglitazone administration and experimental design

The animals were randomly distributed in the following groups: sham + saline (n = 9-12/experiment), sham + pioglitazone 5 mg/kg (n = 9-12/experiment), sham + pioglitazone 15 mg/kg (n = 9-12/experiment), sham + pioglitazone 30 mg/kg (n = 9-12/experiment), MPTP + saline (n = 9-12/experiment), MPTP + pioglitazone 5 mg/kg (n = 9-12/experiment), MPTP + pioglitazone 15 mg/kg (n = 9-12/experiment) and MPTP + pioglitazone 30 mg/kg (n = 9-12/experiment).

In the first experiment, different doses (5, 15 and 30 mg/kg) of pioglitazone (ActosTM, purchased from Abbott, IL, USA) suspended in sterile saline 0.9% or the equivalent volume of saline were administered via gavage one hour after the MPTP infusions. One day after the surgeries, motor behavior was assessed in the open-field test, and immediately after that, the rats were decapitated for striatum dissection and subsequent DA and metabolites quantification.

In the second experiment, we selected a dose of pioglitazone that promoted the most protective effects, according to the parameters tested earlier. We compared the following two protocols of pioglitazone administration: acute and chronic. The acute protocol consisted of a single gavage administration of pioglitazone 1 hour after MPTP. The chronic protocol consisted of a daily administration of pioglitazone starting 1 hour after MPTP and ending 22 days after that. Open-field tests were conducted 1, 7 and 14 days after MPTP; moreover, a 2-way active avoidance task was performed 21 days (training session) and 22 days (test session) after neurotoxin

administration. Subsequently, 23 days after MPTP, the animals were decapitated for tissue isolation and striatal DA and metabolites quantification.

2.4. Open-field test

The apparatus consists of a rectangular box (40×50×63 cm) with a floor divided into 20 (10×10 cm) rectangular units. The animals were gently placed in the right corner of the open-field and were allowed to freely explore the area for 5 min. Two motor parameters were quantified throughout this test: locomotion frequency (number of crossings from one rectangle to the other) and rearing frequency (number of times the animals stood on their hind paws). The open-field was washed with a 5% water-ethanol solution before behavioral testing to eliminate possible bias due to odors left by previous rats.

2.5. Two-way active avoidance task

The two-way avoidance task apparatus consisted of an automated 23 x 50 x 23 cm shuttle-box (GEMINI Avoidance System, San Diego Instruments, CA, USA) with a dark front glass and a floor made of parallel 5 mm calibre stainless steel bars spaced 15 mm apart. The box is divided into two compartments of the same size by a wall with a guillotine door that remained open during the test. In the training session, after 3 min of habituation, sound cues (conditioned stimulus, 1.5 kHz, 60 dB, maximum duration of 5 s) were paired with subsequent 0.4 mA foot shock (unconditioned stimulus, maximum duration of 5 s) until the animal crossed to the other compartment. The animal

could avoid the shock by crossing to the other side during the presentation of the conditioned stimulus (active avoidance). The time between each conditioned stimulus presentation varied randomly, ranging from 10 to 50 s. The number of active avoidances was recorded automatically by the apparatus. The test session conducted 24 h later was identical to the training one except for the absence of the foot shock. After 30 seconds of habituation, the door was opened, and the time taken by the rat to enter the dark compartment was recorded, with a ceiling of 300 seconds before removal of the animals that did not enter the dark compartment. The apparatus was cleaned with a 5% water-ethanol solution before behavioral testing to eliminate possible bias due to odors left by previous rats.

2.6. Determination of striatal DA and metabolites concentrations and DA turnover

The striatum of the rats were rapidly dissected and stored at -80°C until neurochemical quantification. The endogenous concentrations of DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were assayed by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection. Briefly, the system consisted of the following 3 components: the Synergi Fusion-RP C-18 reverse-phase column (150 x 4.6 mm i.d., 4 µm particle size) fitted with a 4 x 3.0 mm pre-column (Security Guard Cartridges Fusion-RP), an electrochemical detector (ESA Coulochem III Electrochemical Detector) equipped with a guard cell (ESA 5020) with the electrode set at 350 mV and a dual electrode analytical cell (ESA 5011A), and a

LC-20AT pump (Shimadzu) equipped with a manual Rheodyne 7725 injector with a 20 μ L loop. The column was maintained inside in a temperature-controlled oven (25°C). The cell contained two chambers in series, each chamber included a porous graphite coulometric electrode, a double counter electrode and a double reference electrode. Oxidizing potentials were set at 100 mV for the first electrode and at 450 mV for the second electrode. The tissue samples were homogenized with an ultrasonic cell disrupter (Sonics) in 0.1 M perchloric acid containing sodium metabisulfite 0.02% and an internal standard. After centrifugation at 10,000xg for 30 min at 4°C, 20 μ L of the supernatant was injected into the chromatograph. The mobile phase, used at a flow rate of 1 mL/min, had the following composition: 20 g citric acid monohydrated (Merck), 200 mg octane-1-sulfonic acid sodium salt (Merck), 40 mg ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma) and 900 mL HPLC-grade water. The pH of the buffer running solution was adjusted to 4.0 then filtered through a 0.45 μ m filter. Methanol (Merck) was added to give a final composition of 10% methanol (v/v). The neurotransmitters and metabolites concentrations were calculated using standard curves that were generated by determining in triplicate the ratios between three different known amounts of the internal standard. The unit was expressed as ng/g of wet weight. Striatal DA turnover was calculated according to the following equation: DA/DOPAC+HVA. The values are expressed without units.

2.7. Statistical analysis

The homogeneity of variance was assessed by the Bartlett test, and the normal distribution of the data was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Differences between groups in the open-field test were analyzed by one (experiment 1) or two-way (experiment 2) analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls post-hoc test. Data from the active avoidance task were analyzed by two-way ANOVA followed by the Newman-Keuls post hoc test. Neurochemical findings were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls post hoc test. Values are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). The level of significance was set at $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1 - neuroprotective effects of different doses of pioglitazone (5, 15 and 30 mg/kg) administered one hour after MPTP

3.1.1. Open-field test

As can be seen in Fig. 1, locomotion frequency obtained 1 day after intranigral MPTP revealed a significant decrease ($P < 0.001$) for the MPTP saline group in comparison to the sham saline group. In addition, the MPTP pioglitazone 5 mg/kg group presented a similar locomotor frequency pattern, with a significant reduction ($P < 0.05$) in comparison to the sham saline group. Conversely, the MPTP groups treated with higher doses of pioglitazone (15 and 30 mg/kg) exhibited significant increases ($P < 0.05$ for both groups) in the locomotion frequency when compared to the MPTP saline group [$F(7.58) = 7.207$; $P < 0.0001$]. The rearing frequency showed a similar pattern to

locomotion frequency. The MPTP saline group and the MPTP pioglitazone (5 mg/kg) group presented a significant reduction in rearing frequency compared to the sham saline group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). Interestingly, the MPTP group treated with a higher dose of pioglitazone (30 mg/kg) showed a significant increase ($P < 0.05$) in the rearing frequency in comparison to the MPTP saline group [$F(7.58) = 4.876$; $P = 0.0002$] (Fig. 1).

3.1.2. Striatal DA concentration and DA turnover

At this point, the neurochemical evaluation showed that the concentration of striatal DA was significantly reduced for both MPTP saline ($P < 0.01$) and MPTP pioglitazone (5 mg/kg) ($P < 0.01$) groups in comparison to the sham saline group (Fig. 2). However, the MPTP pioglitazone (30 mg/kg) group demonstrated a significant increase ($P < 0.01$) in the DA concentration when compared to the MPTP saline group [$F(7.58) = 7.647$; $P < 0.0001$]. Considering the DA turnover, we found that only the MPTP pioglitazone (5 mg/kg) group presented a significant increase ($P < 0.01$) in comparison to the sham saline group [$F(7.58) = 4.198$; $P = 0.0009$] (Fig. 2).

3.2. Experiment 2 - comparison of acute and chronic pioglitazone (30 mg/kg) treatments after intranigral MPTP

3.2.1. Open-field test

Table 1 depicts the results of the locomotion and rearing frequencies obtained from the groups submitted to acute and chronic treatments with pioglitazone (30 mg/kg) after treatment with MPTP. Acute treatment with pioglitazone (30 mg/kg) significantly increased ($P<0.01$) the locomotion frequency in comparison to the MPTP saline group one day after the neurotoxin infusion, as indicated by the interaction factor [$F(10.50) = 4.382$; $P<0.0001$], despite the absence of statistical significance of the treatment [$F(5.50) = 1.30$; $P=0.278$] and time factors [$F(2.50) = 0.074$; $P=0.92$]. Moreover, the MPTP saline group showed a significant reduction ($P<0.001$) in the locomotion frequency when compared to the sham saline group. Chronic treatment showed similar results, one day after neurotoxin, regarding the MPTP pioglitazone (30 mg/kg) and the MPTP saline groups. The MPTP pioglitazone (30 mg/kg) group exhibited a significant increase ($P<0.01$) in the locomotion frequency when compared to the sham saline group one day after MPTP. In addition, the MPTP saline group demonstrated a significant reduction ($P<0.001$) in locomotion frequency in comparison to the sham saline group at the same time-point. Furthermore, seven days after the surgery, the sham pioglitazone (30 mg/kg) group presented an increase in locomotion frequency ($P<0.05$) compared to the sham saline group, as indicated by the treatment factor [$F(3.50) = 9.183$; $P=0.0002$], time factor [$F(2.50) = 49.9$; $P<0.0001$] and interaction [$F(6.50) = 6.915$; $P<0.0001$].

Acute treatment with pioglitazone promoted a significant increase in the rearing frequency ($P<0.01$) in the MPTP pioglitazone (30 mg/kg) group in comparison to the MPTP saline group 1 day after MPTP administration, as demonstrated by the treatment factor [$F(5.50) = 1.987$; $P=0.09$], time factor [$F(2.50) = 4.008$; $P<0.02$] and interaction [$F(10.50) = 2.692$; $P=0.005$]. In addition, the MPTP saline group presented a significant reduction ($P<0.001$) in the rearing when compared to the sham saline group 1 day after MPTP. Chronic treatment with pioglitazone promoted a similar scenario, with a significant increase in the rearing frequency ($P<0.05$) observed 1 day after MPTP administration in the MPTP pioglitazone (30 mg/kg) group in comparison to the MPTP saline group, as indicated by the treatment factor [$F(3.50) = 3.397$; $P=0.03$], time factor [$F(2.50) = 10.92$; $P<0.0001$] and interaction [$F(6.50) = 3.111$; $P=0.009$]. Additionally, the MPTP saline group showed a significant reduction in the rearing frequency ($P<0.01$) when compared to the sham saline group 1 day after MPTP administration.

3.2.2. Two-way active avoidance task

The results presented in Fig. 3 show that the MPTP saline and the MPTP pioglitazone (30 mg/kg) groups presented similar impairments in the learning and memory scores in the two-way active avoidance task. For the acute treatment, these groups presented reduced numbers of avoidances ($P<0.05$, for both) in comparison to the sham saline group during the training session, as specified by the treatment factor [$F(3.30) = 25.03$; $P<0.0001$]. In contrast, the sham saline ($P<0.05$) and sham pioglitazone (30 mg/kg) ($P<0.05$) groups

demonstrated a significant increase in the number of avoidances during the test session in comparison to the training session, as indicated by the session [$F(1.30) = 11.52$; $P=0.002$] and interaction [$F(3.30) = 11.92$; $P<0.05$] factors. Furthermore, the MPTP saline and the MPTP pioglitazone (30 mg/kg) groups showed significant impairment in the number of avoidances ($P<0.01$ for both groups), when compared to the sham saline group during the test session.

Chronic treatment revealed that the sham pioglitazone (30 mg/kg) group presented an increase in the number of avoidances ($P<0.05$), during the training session, compared to the sham saline group. Conversely, the MPTP saline and the MPTP pioglitazone (30 mg/kg) groups demonstrated a significant reduction ($P<0.05$ for both groups) in this parameter compared to the sham saline group, as indicated by the treatment factor [$F(3.30) = 51.17$; $P<0.0001$]. In the test session, the sham saline group exhibited a significant increase ($P<0.001$) in the number of avoidances when compared to the same group during the training session, as demonstrated by the session factor [$F(1.30) = 20.44$; $P<0.0001$] and interaction factor [$F(3.30) = 6.239$; $P=0.002$]. The MPTP pioglitazone (30 mg/kg) ($P<0.001$) and the MPTP saline ($P<0.001$) groups showed significant reductions in the number of avoidances in comparison to the sham saline group during the test session.

3.2.3. Striatal DA concentration and DA turnover

Fig. 4 shows the comparison of acute and chronic treatments regarding the levels of DA within the striatum and its neurotransmitter turnover. In the acute treatment, the MPTP saline group presented a significant decrease ($P < 0.05$) in the DA concentration in comparison to the sham saline group [$F(3.28) = 4.863$; $P = 0.0078$]; however, the MPTP pioglitazone (30 mg/kg) group did not present statistical differences from the sham saline and MPTP saline groups. DA turnover increased ($P < 0.05$) in the MPTP saline group in comparison to the sham saline group [$F(3.28) = 3.729$; $P = 0.02$]. Once more, the MPTP pioglitazone (30 mg/kg) group did not differ from the sham saline and MPTP saline groups. In contrast, the chronic protocol showed that the MPTP pioglitazone (30 mg/kg) group presented a significant reduction ($P < 0.05$) in the striatal DA content in comparison to the sham saline group [$F(3.28) = 7.867$; $P = 0.0006$]. In addition, the MPTP saline group also exhibited a DA reduction compared to the sham saline group. DA turnover was found to be increased for the MPTP saline group compared to the sham saline, and again, the MPTP pioglitazone (30 mg/kg) did not differ statistically from the sham saline and the MPTP saline groups [$F(3.28) = 3.001$; $P = 0.05$].

4. Discussion

The current study demonstrates the beneficial effects of pioglitazone treatment on locomotor and neurochemical parameters associated with the dopaminergic degeneration induced by intranigral MPTP infusion. However, the protection against striatal DA reduction and motor impairment was restricted to the group treated with pioglitazone (30 mg/kg). In addition, the acute and chronic treatments were not able to reverse the cognitive impairment promoted by MPTP. We also demonstrated that the acute treatment generates some level of neuroprotection, as confirmed by the late (23 days after MPTP) absence of reduction of DA in the group treated with pioglitazone in comparison to the sham group. By contrast, chronic treatment with pioglitazone led to a marked reduction of striatal DA, resembling striatal DA levels in the MPTP and saline treatment.

PPAR γ agonists reduce the lipopolysaccharide (LPS) induced microglial iNOS expression and nitric oxide (NO) release, suggesting a neuroprotective effect of PPAR γ agonists via inactivation of microglia [3]. In view of the fact that MPTP induces microglia activation in the SNpc and the activation of microglia by infusion of LPS into the rat brain triggers the degeneration of dopaminergic neurons in the SNpc [24], the inflammation appears to be causally related to dopaminergic neuronal death, as previously demonstrated [15,12,17]. Therefore, PPAR γ agonists, like pioglitazone, are thought to be useful drugs to promote neuroprotective effects via microglial inactivation. However, PPAR γ is not expressed only in glial cells, as the striatum and SNpc neurons also exhibit abundant density of PPAR γ [25,3], suggesting the existence of other

mechanisms that do not depend exclusively on microglial activation. Therefore, we focused on the neurochemical modifications induced by pioglitazone that directly reflects on the functionality of the dopaminergic neurons within the nigrostriatal pathway. Additionally, we characterized a number of behavioral (motor and cognitive) alterations that are characteristically impaired by MPTP.

In our first experiment, we reproduced the typical striatal DA reduction after intranigral MPTP infusion, as reported formerly [14]. Pioglitazone was demonstrated to be effective in reversing the DA depletion only at a dose of 30 mg/kg. Pioglitazone at a dose of 5 mg/kg did not alter the magnitude of DA reduction in comparison to MPTP. Moreover, pioglitazone at a dose of 15 mg/kg did not differ from the MPTP saline group; hence, we cannot conclude the existence of a dose-dependent effect. In addition, DA turnover was elevated by MPTP (not statistically; $P=0.06$) and by MPTP treated with pioglitazone at 5 mg/kg, but not at 15 and 30 mg/kg. This result suggests that pioglitazone at 15 and 30 mg/kg are able to attenuate DA degradation, which is consistent with findings that report the occurrence of MAO-B enzyme inhibition induced by pioglitazone [20]. In addition, locomotion and rearing frequencies that were drastically impaired by MPTP were fully restored by pioglitazone only at 30 mg/kg, corroborating the neurochemical data.

In the second experiment, we compared acute and chronic protocols of pioglitazone (30 mg/kg) administration in order to establish a suitable strategy of neuroprotection induced by a PPAR γ agonist in this PD model. Locomotor and rearing impairment due to intranigral MPTP were restricted to 1 day after the MPTP infusion, as already described [7,26,12]. This result also showed that

pioglitazone could reverse these motor deficits, replicating the findings of experiment one, and generated an increase in the locomotion, but not rearing, seven days after surgery in the sham pioglitazone group. Such results could be interpreted as an outcome of the MAO-B inhibition and consequently the decline of DA degradation, although this effect was not present 14 days after surgery, thus we conclude that pioglitazone did not affect the general activity behavior under normal conditions. Regarding the MPTP-induced hypolocomotion, there was a total recovery 7 and 14 days after MPTP infusion, indicating that it is possible to access cognitive functions later than 14 days, without motor bias, which is a characteristic of this early phase model of PD [8].

Accordingly, acute treatment with pioglitazone did not promoted any kind of beneficial effect on the cognitive behavior of the MPTP-lesioned rats, neither during the training nor during the test sessions. By contrast, sham groups exhibited remarkable performances on learning and memory parameters, indicating intact cognition. With chronic treatment, we also found an absence of a protective effect on cognition; however, the sham pioglitazone group showed increased learning during the training session. This result explains the nonexistence of differences in the number of avoidances between the training and test sessions for that group. Possibly, a ceiling effect was reached for this task in the sham pioglitazone group. Our cognitive results argue with a recent report by Kumar et al. that demonstrated improvements of cognitive performance in the passive avoidance task and cued version of the Morris water maze test due to chronic administration of pioglitazone (10 and 30 mg/kg), starting five days prior to intranigral MPTP and then for the next 30 days [22].

There are several possible explanations for this discrepancy, although we believe that differences in the protocols are the main responsible. For instance, we initiated the treatment 1 hour after MPTP, in an attempt to reverse the events already started by the neurotoxin, whereas Kumar and co-workers tried to prevent the occurrence of a dopaminergic lesion created by MPTP. Certainly more studies are necessary to investigate this issue.

In the striatum, DA concentration was partially restored by acute pioglitazone, 23 days after MPTP infusion. This finding is supported by the decrease of DA turnover in the MPTP pioglitazone group. The chronic protocol could not reverse the striatal DA reduction imposed by MPTP; however, DA turnover seemed to be from the same as the sham groups. Paradoxically, acute treatment appeared to be more efficient to restore DA levels. One possible explanation for this effect relies on the antidiabetic mechanism of pioglitazone. Like other thiazolidinediones, pioglitazone has been shown to enhance basal glucose uptake by regulation of glucose transporters in the peripheral tissue [27,28]. Since, in contrast to the SNpc, striatal glucose uptake remains unchanged or is even reduced in MPTP-treated primates and rodents [29,30], it is also possible that differences in glucose metabolism or the higher energy demand of the striatal nerve terminals compared with the SNpc cell bodies [31] could make the striatum more vulnerable to MPTP toxicity and mask the protective effect of pioglitazone [19].

Taken together our results further substantiate the potential restorative effects promoted by pioglitazone after dopaminergic MPTP toxicity. The present findings suggest that acute administration of pioglitazone at a dose of 30 mg/kg

was the most effective in generating beneficial effects on motor behaviors and in striatal DA levels. Nevertheless, our study failed to demonstrate improvements induced by pioglitazone on a dopamine-related cognitive task after MPTP, indicating that we are far from establishing an administrative protocol of pioglitazone that efficiently provides a full range of beneficial effects. In fact, more studies are needed to elucidate the mechanisms of pioglitazone in a MPTP-induced degeneration, but undoubtedly, pioglitazone offers a new strategy for the treatment of PD and may be tested in clinical trials in the future.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq (REUNI), and CAPES that had no further role in the study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. MABFV is recipient of CNPq fellowship.

References

- [1] Bennett D A, Beckett L A, Murray A M, Shannon K M, Goetz C G, Pilgrim D M and Evans D A. Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N Engl J Med*, 1996;334: 71-76.
- [2] Lang A E and Lozano A M. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, 1998;339: 1044-1053.
- [3] Dehmer T, Heneka M T, Sastre M, Dichgans J and Schulz J B. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I kappa B alpha induction and block of NF kappa B and iNOS activation. *J Neurochem*, 2004;88: 494-501.
- [4] Chiba K, Trevor A and N. C J. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 1984;120: 574–578.
- [5] Lima M M S, Reksidler A B and Vital M A. The neurobiology of the substantia nigra pars compacta: from motor to sleep regulation. *Journal Neural Transm. Suppl.*, 2009;73: 135-145.
- [6] Braga R, Kouzmine I, Canteras N S and Da Cunha C. Lesion of the substantia nigra, pars compacta impairs delayed alternation in a Y-maze in rats. *Exp Neurol*, 2005;192: 134-141.
- [7] Capitelli C, Sereniki A, Lima M M, Reksidler A B, Tufik S and Vital M A. Melatonin attenuates tyrosine hydroxylase loss and hypolocomotion in MPTP-lesioned rats. *Eur J Pharmacol*, 2008;594: 101-108.

- [8] Da Cunha C, Gevaerd M S, Vital M A, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, Takahashi R N and Canteras N S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res*, 2001;124: 9-18.
- [9] Da Cunha C, Wietzikoski S, Wietzikoski E C, Miyoshi E, Ferro M M, Anselmo-Franci J A and Canteras N S. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. *Neurobiol Learn Mem*, 2003;79: 236-242.
- [10] Ferro M M, Bellissimo M I, Anselmo-Franci J A, Angellucci M E, Canteras N S and Da Cunha C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods*, 2005;148: 78-87.
- [11] Lima M M S, Andersen M L, Reksidler A B, Vital M A B F and Tufik S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PLoS ONE*, 2007;2: e513.
- [12] Lima M M S, Braga Reksidler A, Marques Zanata S, Bueno Machado H, Tufik S and Vital M A. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res*, 2006;1101: 117-125.
- [13] Reksidler A B, Lima M M S, Dombrowski P, Andersen M L, Zanata S M, Andreatini R, Tufik S and Vital M A B F. Repeated intranigral MPTP administration: A new protocol of prolonged locomotor impairment mimicking Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*, 2008;167: 268-277.

- [14] Reksidler A B, Lima M M S, Dombrowski P, Barnabé G F, Andersen M L, Tufik S and Vital M A B F. Distinct Effects of Intranigral L-DOPA Infusion in the MPTP Rat Model of Parkinson's Disease. *J. Neural Transm. Suppl*, 2009;73: 259-268.
- [15] Hunter R L, Dragicevic N, Seifert K, Choi D Y, Liu M, Kim H C, Cass W A, Sullivan P G and Bing G. Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J Neurochem*, 2007;100: 1375-1386.
- [16] Reksidler A B, Lima M M S, Zanata S M, Machado H B, da Cunha C, Andreatini R, Tufik S and Vital M A B F. The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. *Eur J Pharmacol*, 2007;560: 163-175.
- [17] Teismann P, Tieu K, Choi D K, Wu D C, Naini A, Hunot S, Vila M, Jackson-Lewis V and Przedborski S. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003;100: 5473-5478.
- [18] Vijitruth R, Liu M, Choi D Y, Nguyen X V, Hunter R L and Bing G. Cyclooxygenase-2 mediates microglial activation and secondary dopaminergic cell death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*, 2006;3: 6.
- [19] Breidert T, Callebert J, Heneka M T, Landreth G, Launay J M and Hirsch E C. Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 2002;82: 615-624.

- [20] Quinn L P, Crook B, Hows M E, Vidgeon-Hart M, Chapman H, Upton N, Medhurst A D and Virley D J. The PPARgamma agonist pioglitazone is effective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease through inhibition of monoamine oxidase B. *Br J Pharmacol*, 2008;154: 226-233.
- [21] Moraes L A, Piqueras L and Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*, 2006;110: 371-385.
- [22] Kumar P, Kaundal R K, More S and Sharma S S. Beneficial effects of pioglitazone on cognitive impairment in MPTP model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 2009;197: 398-403.
- [23] Paxinos G and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 2005;5th edition San Diego: Academic Press:
- [24] Gao H M, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong J S and Liu B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem*, 2002;81: 1285-1297.
- [25] Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M and Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 1996;137: 354-366.
- [26] Lima M M S, Andersen M L, Reksidler A B, Vital M A B F and Tufik S. Effects of sleep deprivation on tyrosine hydroxylase expression and dopamine-related behaviors in two models of Parkinson's Disease. *Sleep Medicine*, 2007;8, Suppl 1: S103.

- [27] el-Kebbi I M, Roser S and Pollet R J. Regulation of glucose transport by pioglitazone in cultured muscle cells. *Metabolism*, 1994;43: 953-958.
- [28] Smith U. Pioglitazone: mechanism of action. *Int J Clin Pract Suppl*, 2001 13-18.
- [29] Palacios J M and Wiederhold K H. Acute administration of 1-N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), a compound producing parkinsonism in humans, stimulates [2-14C]deoxyglucose uptake in the regions of the catecholaminergic cell bodies in the rat and guinea pig brains. *Brain Res*, 1984;301: 187-191.
- [30] Palombo E, Porrino L J, Bankiewicz K S, Crane A M, Kopin I J and Sokoloff L. Administration of MPTP acutely increases glucose utilization in the substantia nigra of primates. *Brain Res*, 1988;453: 227-234.
- [31] Sokoloff L. Sites and mechanisms of function-related changes in energy metabolism in the nervous system. *Dev Neurosci*, 1993;15: 194-206.

Table Legends

Table 1: Temporal motor behavior alterations promoted by acute or chronic pioglitazone administrations after intranigral MPTP infusion. The values are expressed as mean \pm SEM (n=10-12/ group). Differences between groups are indicated by letters: *P<0.05; **P<0.01 and ***P<0.001 compared to the sham saline group; #P<0.05; ##P<0.01 compared to the MPTP saline group. Two-way ANOVA with repeated measures followed by the Newman-Keuls test.

Figure Legends

Figure 1: Dose-response curve of locomotion and rearing frequencies obtained 1 day after the administration of 3 doses of pioglitazone (5, 15 and 30 mg/kg) injected one hour after intranigral MPTP infusion. Values are expressed as mean \pm SEM (n=8-12/ group). *P<0.05; **P<0.01 and ***P<0.001 compared to the sham saline group. #P<0.05 compared to the MPTP saline group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

Figure 2: Dose-response curve of striatal DA concentration and DA turnover obtained one day after the administration of three doses of pioglitazone (5, 15 and 30 mg/kg) injected one hour after intranigral MPTP infusion. Values are expressed as mean \pm SEM (n=8-12/ group). **P<0.01 compared to the sham saline group. ##P<0.01 compared to the MPTP saline group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

Figure 3: Effects of acute and chronic administration protocols of pioglitazone (30 mg/kg) on the two-way active avoidance task. Values are expressed as mean \pm SEM (n=8-12/ group). *P<0.05; **P<0.01 and ***P<0.001 compared to the correspondent sham saline group. +P<0.05 and +++P<0.001 compared to the correspondent sham group on training session. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

Figure 4: Effects of acute and chronic administration protocols of pioglitazone (30 mg/kg) on the striatal DA concentration and DA turnover. Values are expressed as mean \pm SEM (n=8-12/ group). *P<0.05 and **P<0.01 compared to the sham saline group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

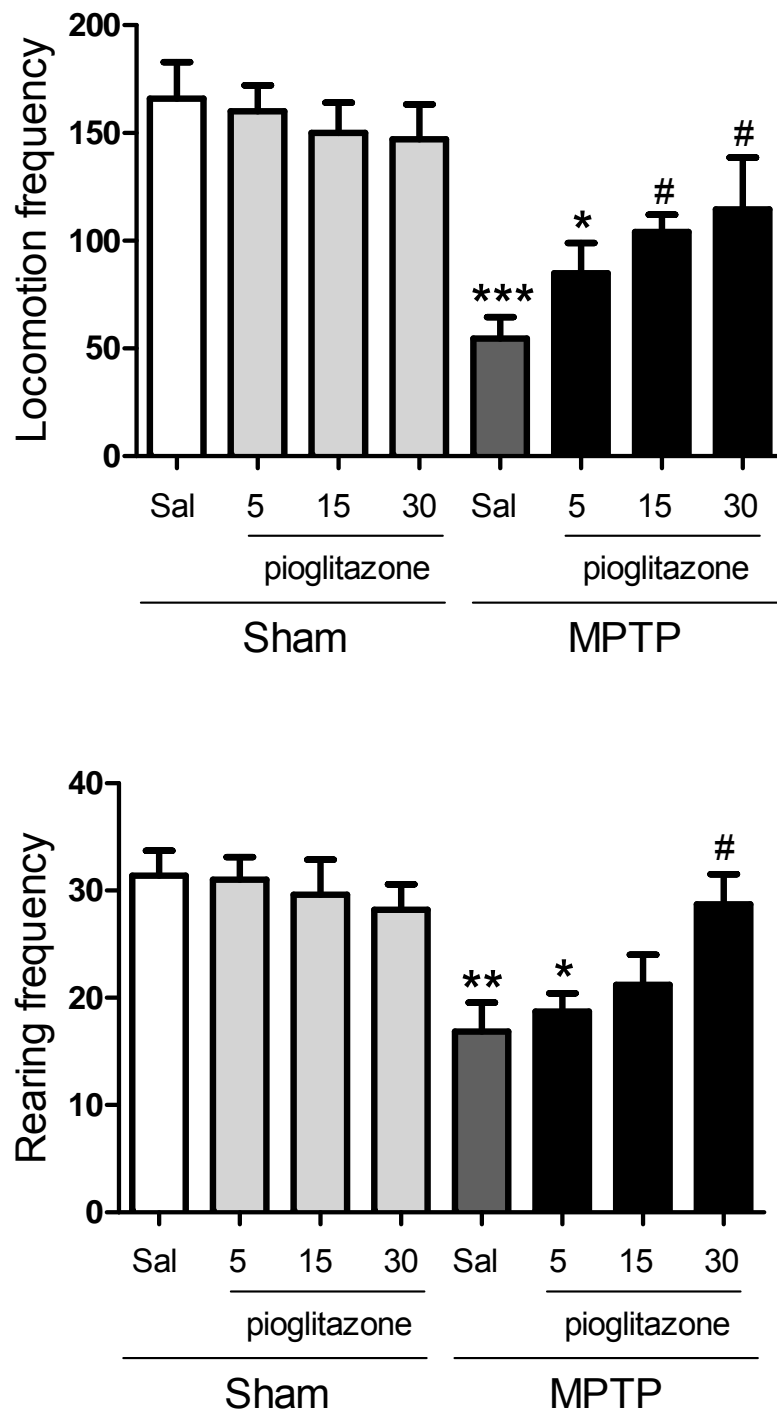


Figure 1

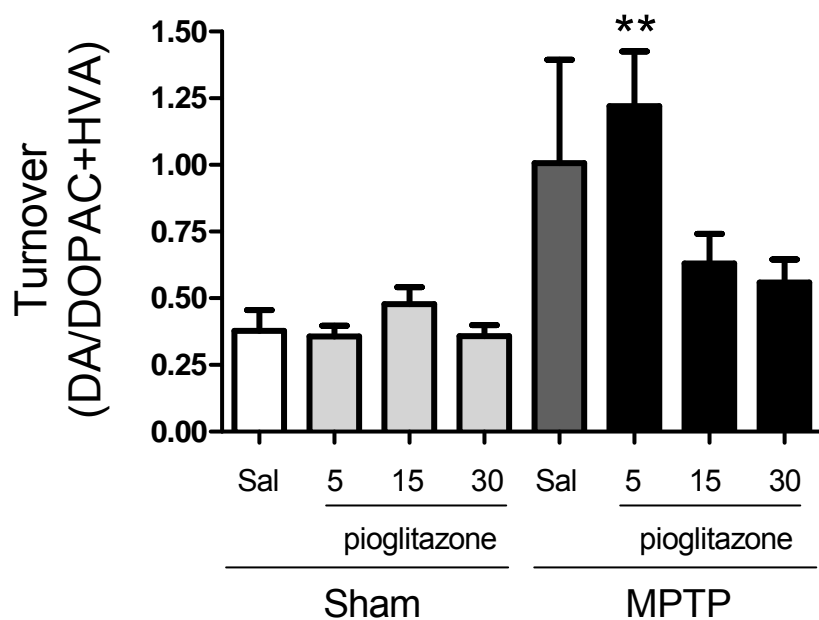
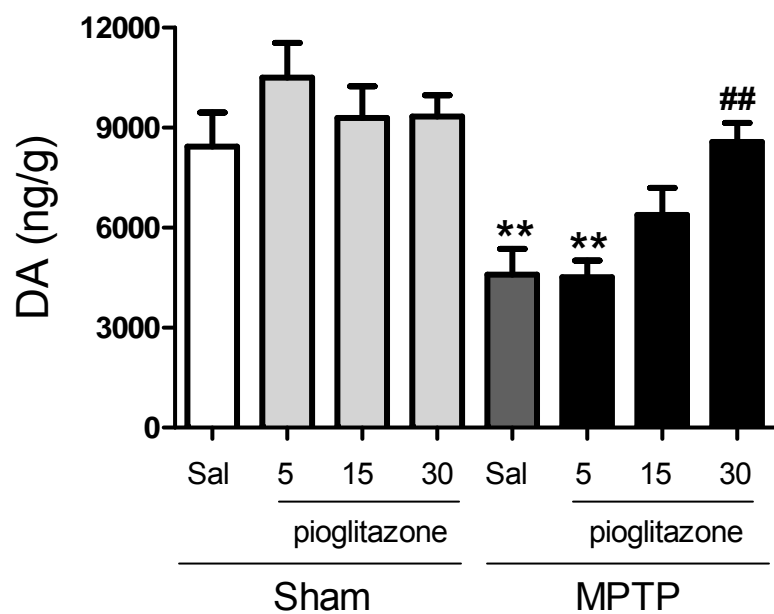


Figure 2.: 1 day acute

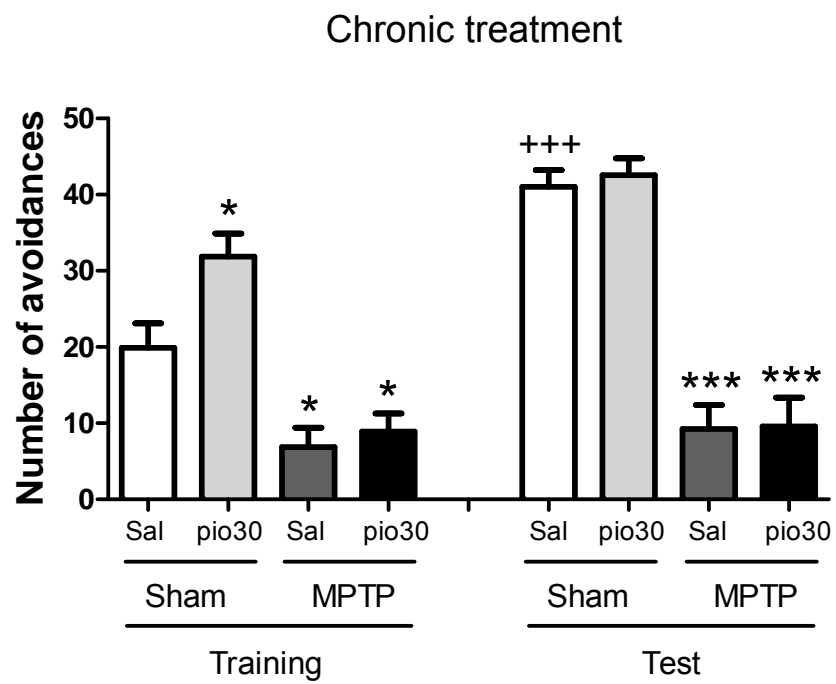
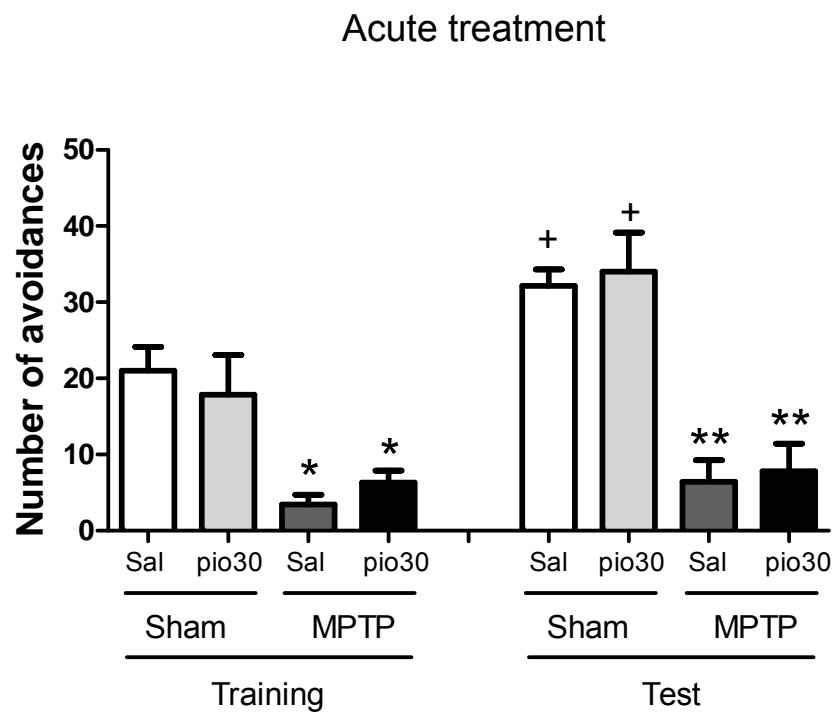


Figure 3

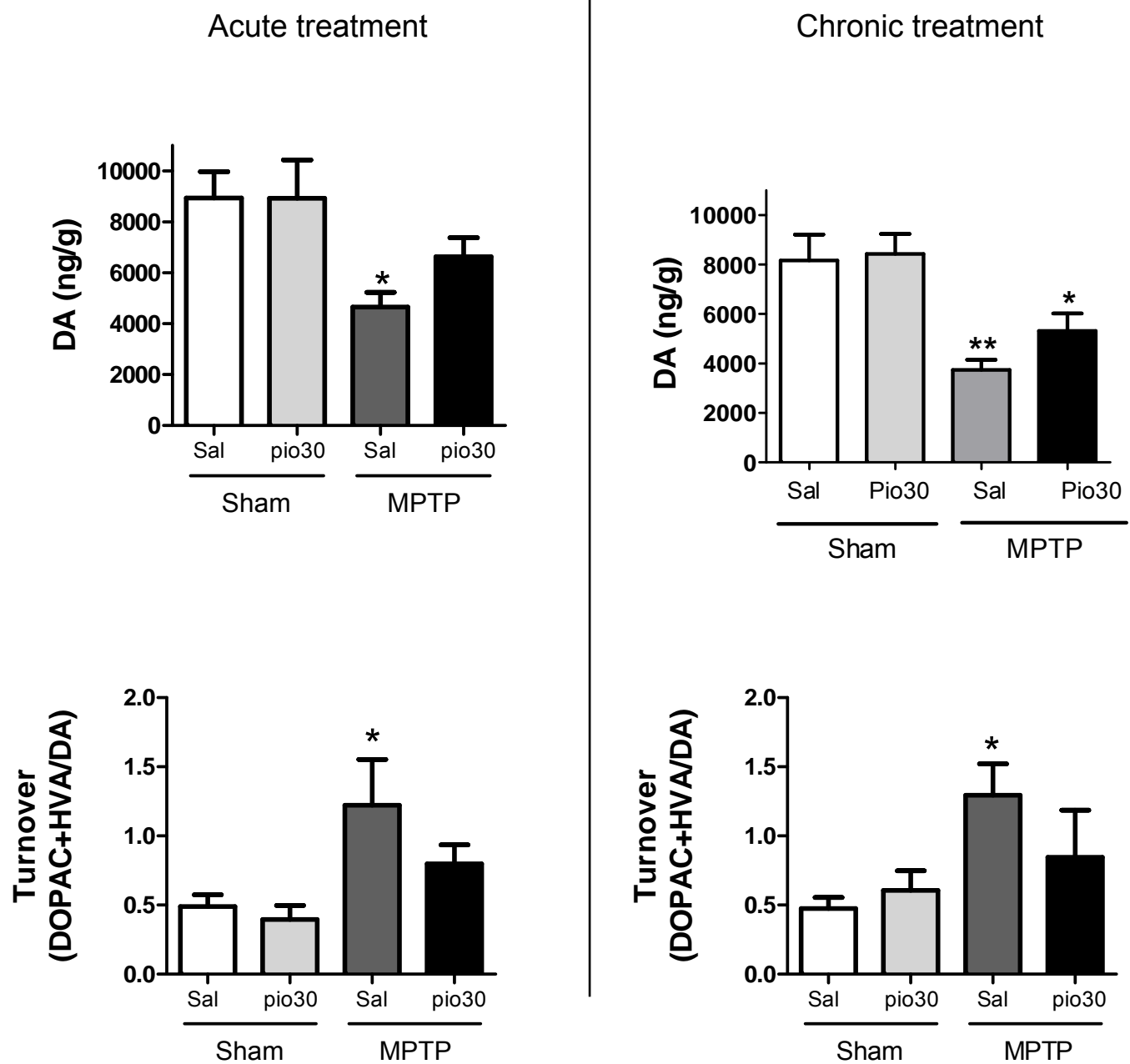


Figure 4

OBS: post hoc Neumann-Keuls

Figure 5 HPLC 23 days acute

Groups	Time-points (days)	Locomotion frequency		Rearing frequency	
		Acute	Chronic	Acute	Chronic
Sham saline	1	93.8±4.6	118.5±5.6	30.1±1.7	28.0±2.8
	7	81.8±9.2	127.7±4.3	22.6±3.9	30.1±2.2
	14	76.0±10.4	142.6±5.7	23.6±2.9	30.7±2.5
Sham pioglitazone (30 mg/kg)	1	97.3±8.2	115.1±5.1	28.4±1.7	32.8±2.2
	7	76.1±9.0	147.2±8.5 [*]	22.2±2.6	33.3±2.2
	14	85.6±10.3	131.4±5.4	23.3±2.9	30.1±2.9
MPTP saline	1	45.6±6.2 ^{***}	65.0±5.8 ^{***}	11.3±1.6 ^{***}	17.6±1.8 ^{**}
	7	98.3±7.0	125.9±4.7	25.8±4.6	29.9±1.2
	14	90.9±16.7	132.9±4.2	19.2±3.2	28.8±2.5
MPTP pioglitazone (30 mg/kg)	1	97.2±10.0 ^{##}	103.6±3.0 ^{##}	28.4±2.4 ^{##}	26.6±1.4 [#]
	7	102.5±8.6	126.5±4.2	24.6±1.2	34.1±2.3
	14	96.6±4.5	133.5±8.7	23.8±1.7	34.4±1.8

Table 1

4. CONCLUSÕES

4.1. CONCLUSÃO GERAL

A pioglitazona 30mg/kg exerceu um efeito neuroprotetor sobre o sistema dopaminérgico nigroestriatal.

4.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

A hipolocomoção observada no campo aberto causada pela infusão intranigral de MPTp foi completamente restaurada pela pioglitazona 30mg/kg, confirmando os dados neuroquímicos.

Tanto o tratamento agudo quanto o prolongado com pioglitazona 30mg/kg não foi capaz de reverter o prejuízo cognitivo provocado pelo MPTP observado na esquiva ativa de duas vias.

No estriado, a concentração de DA foi parcialmente restaurada tanto pelo tratamento agudo quanto pelo tratamento prolongado com pioglitazona 30mg.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L.A.F, 2005. Doença de Parkinson: Uma visão panorâmica. In: Doença de Parkinson: aspectos clínicos e cirúrgicos. São Paulo: Atheneu, 1:1-3.

BANATI, R. B., DANIEL, S.E., BLUNT, S.B., 1998. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Mov Disord* 13(2):221-7.

BENNETT D. A., BECKETT L. A., MURRAY A. M., SHANNON K. M., GOETZ C. G., PILGRIM, D. M. e EVANS, D. A., 1996. Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N Engl J Med* 334:71-76.

BERMAN, S.B. e HASTINGS, T.G., 1997. Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species. *J Neurochem*, v. 69, p. 1185-1195.

BERMAN, S. B. e HASTINGS, T.G., 1999. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem*, v. 73, p. 1127-1137.

BLUM, D., TORCH, S., LAMBENG, N., NISSOU, M. F., SADOUL, R. e VERNA, J. M., 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. 65, 2, 135-172.

BRAAK, H., TREDICI, K. D., RUB, U., VOS, R. A. I., STEUR, E. N. H. J. e BRAAK, E., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, v.24, p. 197-211.

BREESE G. R. e TRAYLOR, T. D., 1971. Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine. *Br J Pharmacol* 42:88–99.

BROOKS A. I., CHADWICK C. A., GELBARD H. A., CORY-SLECHTA D. A., FEDEROFF H. J., 1999. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res* 823:1–10

CHEN, S. e LE, W., 2006. Neuroprotective Therapy in Parkinson Disease. *American Journal of Therapeutics* 13, 445–457.

CROSS A. K., WOODROOFE M. N., 2001. Immunoregulation of microglial functional properties. *Microsc Res Tech*. 54(1):10–17.

DA CUNHA, C.; GEVAERD, M. S.; VITAL, M. A. B. F., MIYOSHI, E., ANDREATINI, R., SILVEIRA, R., TAKAHASHI, R. N. e CANTERAS, N. S., 2001. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model

for early Parkinson's disease amnesia. Behavioural Brain Research, v. 124, p. 9-18.

DAUER, W. e PRZEDBORSKI, S., 2003. Parkinson's disease: Mechanism and Models. **Neuron**, v. 39, p.889-909.

DAVIE C. A., 2008. A review of Parkinson's disease. British Medical Bulletin, 86: 109–127.

DEREK A., DRECHSEL e MANISHA PATEL., 2008. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. Free Radical Biology & Medicine 44:1873–1886.

DRECHSEL, A. D. e PATEL, M., 2008. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. Free Radical Biology & Medicine, 44: 1873–1886.

ERIKSEN, J. L., WSZOLEK, Z. e PETRUCELLI, L., 2005. Molecular Pathogenesis of Parkinson Disease. Arch Neurol. 62:353-357.

DAMIER, P., HIRSCH, E. C., ZHANG, P., AGID, Y. e JAVOY-AGID, F., 1993. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. Neuroscience. 52:1–6.

DEFRONZO, R. A., 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am.* 88:787-835.

DEHMER, T., HENKA, M. T., SASTRE, M., DICHGANS, J. e SCHULZ, J. B., 2004. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I κ B α induction and block of NF κ B and iNOS activation. *Journal of Neurochemistry.* 88: 494–501.

DINGLELINE, R., BORGES, K., BOWIE, D. e TRAYNELIS, S. F., 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7–61.

DOBLE, A., 1999. The role excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol. Ther.*, v.81 (3), p.163-221.

DRECHSEL, A. D. e PATEL, M., 2008. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 44: 1873–1886.

EMERIT, J. et al., 2004. Neurodegenerative disease and oxidative stress. *Biomedicine Pharmacotherapy*, v. 58, p.39-46.

FAHN, S., 2003. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 991, pp. 1–14.

FERNAGUT, P. O., HUTSON, C. B., FLEMING, S. M., TETREAUT, N. A., SALCEDO, J., MASLIAH, E. e CHESSELET, M. F, 2007. Behavioral and

histopathological consequences of paraquat intoxication in mice: effects of alpha-synuclein over-expression. *Synapse* 61:991–1001

FERRO, M. M., BELISSIMO, M. I., ANSELMO-FRANCI, J. A., ANGELLUCCI, M. E. M., CANTERAS, N. S. e DA CUNHA, C., 2005. Comparison of bilaterally 6-OHDA and MPTP- lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory, pp. 78-87.

FLEMING, S. M., SALCEDO, J., FERNAGUT P. O., ROCKENSTEIN, E., MASLIAH, E., LEVINE, M. S. e CHESSELET, M. F, 2004. Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. *J Neurosci* 24:9434–9440

GESI, M., SANTINAMI, A. e RUFFOLI, R., 2001. Novel aspects of dopamine oxidative metabolism (confounding outcomes take place of certainties). **Pharmacol Toxicol**, v. 89, p. 217-224.

GOTZ, M. E., KUNING, G., RIEDERER, P. e YODIM, M. B., 1994. Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. **Pharmacol Ther**, v. 63, p. 37-122.

GREENAMYRE, J. T., SHERER, T. B., BETARBET, R. e PANOVA, A. V., 2001. Complex I and Parkinson's disease, *IUBMB Life*, 52(3-5), 135-41.

GREENAMYRE, J. T., ELLER, R. V., ZHANG, Z. et al., 1994. Antiparkinsonian effects of remacemide hydrochloride, a glutamate antagonist, in rodent and primate models of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, v. 35, p. 655-661.

HENEKA, M. T., LANDRETH, G. E., HULL, M., 2007. Drug insight: effects mediated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in CNS disorders. *Nat Clin Pract Neurol*, 3:496-504.

HIRSCH, E. C. e HUNOT, S., 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target of neuroprotection? *Lancet neurology*, 8:382-393.

HUNTER, R.L., e BING, G., 2007. Agonism of peroxisome proliferator receptor-gamma may have therapeutic potential for neuroinflammation and parkinson's disease. *Current Neuropharmacology*, 5: 35-46.

HSU, Y., SAGARA, A., ARROYO, E., ROCKENSTEIN, A., SISK, M., MALLORY, J., WONG, T., TAKENOUCHI, M., HASHIMOTO e MASLIAH, E., 2000. α -Synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am. J. Path.* 157, pp. 401-410.

IACOVITTI, L., STULL, N. D. e MISHIZEN, A., 1999. Neurotransmitters, KCl and antioxidants rescue striatal neurons from apoptotic cell death in culture. *Brain Res.* 816, pp. 276-285.

IRWIN, I. e LANGSTON, W., 1985. Selective accumulation of MPP⁺ in the substantia nigra: a key to neurotoxicity? *Life Science*, v.36, p.207-212.

JELLINGER, K. A., 1988. Pathology of Parkinson's syndrome. In: CALNE, D.B. (ed). *Handbook of experimental pharmacology*, vol. 88. Springer, New York, pp. 47- 112.

KUMAR, P., KAUNDAL, R. K., MORE, S. e SHARMA, S. S., 2009. Benefical effects of pioglitazone on cognitive impairment in MPTP model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 398-403.

KUTER, K., SMIALOWSKA, M., WIERONSKA, J., ZIEBA, B., WARDAS, J., PIETRASZEK, M., NOWAK, P., BIEDKA, I., ROCZNIAK, W., KONIECZNY, J., WOLFARTH, S. e OSSOWSKA, K., 2007. Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons in rats. *Brain Res* 1155:196–207.

KUHN, D.M., ARTHUR, Jr. R. E., THOMAS, D. M. e ELFERINK, L. A., 1999. Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 73, p. 1309-1317.

LANDRIGAN, P. et al., 2005. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environmental Health Perspectives*, v.113 (9), p. 1230-1233.

LANGSTON, J. W. e IRWIN, I., 1986. Clin. Neuropharmacol. 9, 485–507.

LANG, A. E. e LOZANO, A. M., 1998. Parkinson's disease. First of two parts. N Engl J Med 339:1044-1053.

LIMA, M. M. S., ANDERSEN, M. L., REKSIDLER, A. B., VITAL, M. A. B. F. e TUFIK, S., 2007. Effects of sleep deprivation on tyrosine hydroxylase expression and dopamine-related behaviors in two models of Parkinson's Disease. Sleep Medicine 8, Suppl 1:S103.

LINDNER, M. D., CAIN, C. K., PLONE, M. A., FRYDEL, B. R., BLANEY, T. J., EMERICH, D. F. e HOANE, M. R., 1999. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. Behavioural Brains Research, v. 102, p. 1-16.

LUTHMAN, J., FREDRIKSSON, A., SUNDSTROM, E., JONSSON, G. e ARCHER, T., 1989. Selective lesion of central dopamine or noradrenalin neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine.

MANNING-BOG, A. B., MCCORMACK, A. L., LI, J., UVERSKY, V. N., FINK, A. L. e DI MONTE, D. A., 2002. The herbicide paraquat causes upregulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. J Biol Chem 277:1641–1644

MARKEY, S. P., JOHANNESSEN, J. N., CHIUEH, C. C., BUMS, R. S. e HERKENHAM, M. A., 1984. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 311, 464–467.

MAYER, E., DUNNETT, S. B., PELLITTERI, R. e FAWCETT, J. W., 1993. Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons—I. Effects in vitro. *Neuroscience*. 56(2):379–88.

MENESES, M. S. e TEIVE, H. A. G., 2003. Doença de Parkinson. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan.

MCGEER, P. L., ITAGAKI, S., BOYES, B. E. e MCGEER, E. G., 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. 38:1285–91.

MCNAUGHT, K. S. e OLANOW, C. W., 2006. Proteasome inhibitor-induced model of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 60: 243–247.

MEREDITH, G. E., SONSALLA, P. K. e CHESSELET, M. F., 2008. Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol* 115:385–398.

MIYASAKI, J. M., MARTIN W., SUCHOWERSKY, O., WEINER, W. J. e LANG, A. E., 2002. Practice parameter: initiation of treatment for Parkinson's disease:

an evidence based review: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 58:11-7.

PARAIN, K., MURER, M. G., YAN, Q., FAUCHEUX, B., AGID, Y., HIRSCH, E. e RAISMAN-VOZARI, R., 1999. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport*. 10(3):557–61.

PARK, S. W., MIRANPURI, G., SATRIOTOMO, I., BOWEN, K., RESNICK, D.K., VEMUGANTI, R., 2006. Thiazolidinedione class of PPAR γ agonists prevent neuronal damage, motor dysfunction, myelin loss, neuropathic pain and inflammation following spinal cord injury in adult rats. *J. Pharm. Exp. Ther.* (Fast Forward Published online).

PATEL, S., SINGH, V., KUMAR, A., GUPTA, Y. K., e SINGH, M. P., 2006. Status of antioxidant defense system and expression of toxicant responsive genes in striatum of maneb-and paraquatinduced Parkinson's disease phenotype in mouse: Mechanism of neurodegeneration. *Brain Research*, 1081, 9–18.

PATEL, S., SINHA, A., e SINGH, M. P., 2007. Identification of differentially expressed proteins in striatum of maneb-and paraquatinduced Parkinson's disease phenotype in mouse. *Neurotoxicology and Teratology*, 29, 578–585.

PATEL, S., SINGH, K., SINGH, S. e SINGH, M. P., 2008. Gene expression profiles of mouse striatum in control and maneb + paraquat-induced Parkinson's disease phenotype: Validation of differentially expressed energy metabolizing transcripts. *Mol. Biotechnol.* 40: 59-68.

PENG, J., STEVENSON, F. F., DOCTROW, S. R. e ANDERSEN, J. K., 2005. Superoxide dismutase/catalase mimetics are neuroprotective against selective paraquat-mediated dopaminergic neuron death in the substantia nigra: implications for Parkinson disease. *J Biol Chem* 280:29194–29198.

PERRY, J. C., DA CUNHA, C., ANSELMO-FRANCI, J., ANDREATINI, R., MIYOSHI, E., TUFIK, S. e VITAL, M. A. B. F., 2004. Behavioural and Neurochemical effects phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra of rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 484, p. 225-233, 2004.

PETZINGER, G. M., et al., 2007. Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. *Journal of Neuroscience*. 27(20): 5291-5300.

PRZEDBORSKI, S. e ISCHIROPOULOS, H., 2005. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signaling* 7:685– 693.

PRZEDBORSKI, S., 2005. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 11:S3-S7.

QUINN, L. P., CROOK, B., HOWS, M. E., VIDGEON-HART, M., CHAPMAN, H. e UPTON, N., 2008. The PPARgamma agonist pioglitazone is effective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease through inhibition of monoamine oxidase B. *Br J Pharmacol*, 154:226-33.

RAMSAY, R. R., DADGAR, J., TREVOR, A., e SINGER, T. P., 1986. *Life Sci.* 39, 581–588.

RAMSAY, R. R., e SINGER, T. P., 1986. *J. Biol. Chem.* 261, 7585–7587.

REKSIDLER, A. B., LIMA, M. M. S., ZANATA, S. M., MACHADO, H. B., DA CUNHA, C., ANDREATINI, R., TUFIK, S. e VITAL, M. A. B. F., 2007. The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. *European journal of pharmacology* 560(2-3):163-75.

RIACHI, N. J., LAMANNA, J. C. e HARIK, S. I., 1989. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249, 744–748.

RIEDER, C. R. M., BIANCHIN, M. M., SCHRÖDER, N., 2004. Aspectos Neuropsiquiátricos da Doença de Parkinson. In: KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos*. Artmed Editora S.A., São Paulo.

SIAN, J., DEXTER, D. T., LEES, A. J. et al., 1994. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann. Neurol.*, v. 36, p. 348-355.

SINGH, N., PILLAY, V. e CHOONARA, Y. E., 2006. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 29-44.

SINGER, T. P. N., CASTAGNOLI, JR., R. R., RAMSAY, e YREVOR, A. J., 1987. Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, *J neurochem.* 49, 1.

SKYLER, J. S., 2004. Diabetes mellitus: pathogenesis and treatment strategies. *J Med Chem.* 47:4113-7.

SOFIC, E., LANGE, K. W., JELLINGER, K., et al., 1992. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, v.142, p.128-130.

SULZER, D. e ZECCA, L., 2000. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox Res*, v. 1, p. 181-195.

TAKAHASHI, H. e WAKABAYASHI, K., 2005. Controversy: Is Parkinson's disease entity? Yes. *Parkinsonism and Related Disorders*, v. 11, p. S31-S37.

TANNER, C. M.; OTTMAN, R.; GOLDMAN, S. M.; ELLENBERG, I.; CHAN, P.; MAYEUX, R.; LANGSTON, I. W., 1999. Parkinson's disease I twins: an etiologic study. JAMA, V. 28 (4), P. 341-346.

TAVARES, V., HIRATA, M. H. e HIRATA, R. D. C., 2007. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ): Estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. Arq Bras Endocrinol Metab.

THIRUCHELVAM, M., MCCORMACK, A., RICHFIELD, E. K., BAGGS, R. B., TANK, A. W. e DI MONTE, D. A., et al., 2003. Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. Eur J Neurosci 18:589–600.

TANNER, C. M., OTTMAN, R., GOLDMAN, S. M., ELLENBERG, J., CHAN, P., MAYEUX, R. e LANGSTON, J. W., 1999. Parkinson disease in twins: an etiologic study. JAMA, v. 281(4), p. 341-346.

VACCARI, A., FERRARO, L., SABA, P., RUIU, S., MOCCI, I., ANTONELLI, T. e TANGANELLI, S., 1998. Differential mechanisms in the effects of disulfiram and diethyldithiocarbamate intoxication on striatal release and vesicular transport of glutamate. J Pharmacol Exp Ther 285:961–967.


VACCARI, A., SABA, P. L., RUIU, S., COLLU, M., DEVOTO, P., 1996. Disulfiram and diethyldithiocarbamate intoxication affects the storage and release of striatal dopamine. *Toxicol Appl Pharmacol* 139:102–108.

VILA, M., PRZEDBORSKI, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39:889-909.

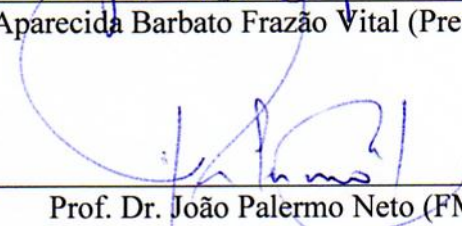
WATKINS, J. C. e OLVERMAN, H. J., 1987. Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci*, v. 10, p. 265.

PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado "ADMINISTRAÇÃO AGUDA MAS NÃO CRÔNICA DE PIOGLITAZONA PROMOVEU EFEITOS PROTETORES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS NO MODELO MPTP DA DOENÇA DE PARKINSON", de autoria da pós-graduanda **JANAINA BARBIERO**, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital e composta pelos professores: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof. Dr. João Palermo Neto (FMVZUSP); Prof^a. Dr^a. Anete Curte Ferraz (UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 30 de março de 2010.



Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (Presidente - Farmacologia - UFPR)




Prof. Dr. João Palermo Neto (FMVZUSP)



Prof^a. Dr^a. Anete Curte Ferraz (UFPR)

1 **ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

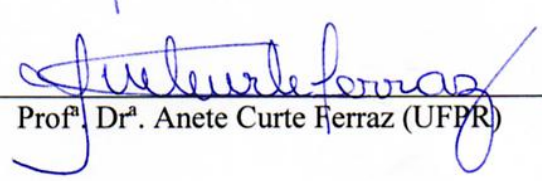
2 Ao trigésimo dia do mês de março do ano de dois mil e dez, às quatorze horas, no
3 Anfiteatro nº 03 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná,
4 reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria da pós-
5 graduanda em Farmacologia **JANAINA BARBIERO** intitulada: "ADMINISTRAÇÃO
6 AGUDA MAS NÃO CRÔNICA DE PIOGLITAZONA PROMOVEU EFEITOS
7 PROTETORES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS NO MODELO DE
8 MPTP DA DOENÇA DE PARKINSON", sob orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida
9 Barbato Frazão Vital e composta pelos professores: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Barbato
10 fração Vital (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof. Dr. João Palermo Neto
11 (FMVZUSP); Prof^a. Dr^a. Anete Curte Ferraz (UFPR). A Banca Examinadora iniciou os
12 trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho,
13 sendo em seguida argüido durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e
14 tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão
15 Examinadora emitiu o seguinte parecer: aprovada. De acordo com o
16 Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi
17 aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão
18 conferidas pela sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por
19 encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pela Presidente e
20 pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 30 de março de 2010.

21
22
23


Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (Presidente - Farmacologia - UFPR)



Prof. Dr. João Palermo Neto (FMVZUSP)



Prof^a. Dr^a. Anete Curte Ferraz (UFPR)

